

2m 11.3353.4

Université de Montréal

**Rôle de TLR2 dans la réponse inflammatoire induite
par *Streptococcus suis* de type 2**

par

Richard Graveline

11713348

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Septembre 2005

©Richard Graveline, 2005



SF

607

U54

2006

V.007

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle de TLR2 dans la réponse inflammatoire induite
par *Streptococcus suis* de type 2

présenté par

Richard Graveline

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

John M. Fairbrother
président-rapporteur

Marcelo Gottschalk
directeur de recherche

Mariela Segura
co-directrice de recherche

Fatiha Chandad
membre du jury

RÉSUMÉ

Streptococcus suis est un pathogène du porc, occasionnellement responsable de zoonoses dont les formes les plus sévères sont la méningite et le choc septique. Ce type d'infection est dû en partie à la libération de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires au niveau systémique et du système nerveux central et implique, dans le cas de *S. suis*, l'intervention en partie de la glycoprotéine CD14. Récemment, il a été démontré que la libération des médiateurs de l'inflammation est due à la reconnaissance des pathogènes par la famille de récepteurs Toll-Like (TLRs). Chez l'homme, 11 TLRs ont été identifiés. Parmi eux, TLR4 et TLR2 sont principalement responsables de la reconnaissance des composants de surface des bactéries. L'objectif de cette étude a consisté à chercher lequel de ces deux TLRs est impliqué dans la reconnaissance de *S. suis*. En stimulant des lignées de macrophages humains et murins, nous avons montré que *S. suis* influence la transcription de TLR2 et de CD14. De plus, cette bactérie induit la libération de cytokines et chimiokines. En revanche, cette libération est inhibée par un anticorps anti-TLR2 (et non anti-TLR4) ou chez des macrophages provenant de souris TLR2ko, montrant ainsi que cette activation implique l'intervention de TLR2, et non de TLR4. De plus, l'activation de la cascade inflammatoire utilise MyD88 comme molécule adaptatrice. En comparant la souche de *S. suis* capsulée à son mutant non capsulé (ainsi qu'en utilisant des préparations de capsule et de paroi bactérienne purifiées), nous avons aussi montré que la paroi joue un rôle important dans l'activité pro-inflammatoire et que la capsule contribue à l'activation de MCP-1 par un mécanisme TLR-indépendant. Cette étude contribue ainsi à mieux comprendre les mécanismes utilisés par *S. suis* pour induire une réponse inflammatoire lors d'une méningite.

Mots clés : *Streptococcus suis*, zoonose, méningite, inflammation, TLR, capsule, paroi bactérienne.

SUMMARY

Streptococcus suis is a swine pathogen which occasionally causes disease in humans. As in pigs, meningitis as well as toxic shock are considered to be the most severe forms of the disease in humans. This is due to the release of several pro-inflammatory cytokines and chemokines systemically and locally in the central nervous system. The involvement of CD14 during *S. suis* infections has recently been elucidated. Also, it has been shown that for the activation of the inflammatory response, the recognition of pathogens by the family of Toll-Like receptors (TLRs) is required. To date, 11 TLRs have been identified. Among them, TLR4 and TLR2 mainly recognize cell surface components of bacteria. The purpose of this study was to evaluate the relative role of these two receptors in the activation of macrophages by *S. suis*. We have shown in this study that stimulation of human and mouse macrophages by *S. suis* influences the relative expression levels of TLR2 and CD14 mRNA. Moreover, this stimulation triggered the release of cytokines and chemokines. However, this activation decreased when cells were pre-incubated with monoclonal antibodies against TLR2 (but not against TLR4). Similar results were obtained when TLR2 deficient cells were stimulated by *S. suis*. Taken together, these data shed light on the role of TLR2 in the recognition of *S. suis*. Moreover, this mechanism requires the involvement of MyD88. By comparing an encapsulated strain to its non-encapsulated mutant (as well as with purified capsule and cell wall), it was also demonstrated that the cell wall is mainly responsible for this activation and that the capsule activates the release of MCP-1 in a TLR-independent manner. Thus, this study contributes to a better understanding of the inflammatory response during meningitis caused by this pathogen.

Keywords : *Streptococcus suis*, zoonose, meningitis, inflammation, TLR, capsule, cell wall.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	x
I- INTRODUCTION	1
II- RECENSION DE LA LITTERATURE	4
1. <i>STREPTOCOCCUS SUIS</i>	5
1.1. Description	5
1.2. Prévalence et identification des différents sérotypes	6
1.3. Infections à <i>S. suis</i> chez le porc	7
1.4. Infections à <i>S. suis</i> chez l'humain	8
1.5. Facteurs de virulence	9
1.5.1. La capsule polysaccharidique	9
1.5.2. MRP (muramidase-released protein) et EF (Extracellular protein factor).	10
1.5.3. Suilysine	11
1.5.4. Autres facteurs de virulence	12

1.6. Étapes dans le développement d'une méningite associée à <i>S. suis</i>	13
1.6.1. Voie d'entrée de <i>S. suis</i>	13
1.6.2. Dissémination de <i>S. suis</i> dans l'organisme	15
1.6.3. Entrée de <i>S. suis</i> dans le système nerveux central	15
1.6.4. Activation des cellules par <i>S. suis</i>	17
2. PATHOPHYSIOLOGIE DU CHOC SEPTIQUE	18
2.1. Médiateurs de l'inflammation	18
2.1.1. Cytokines	18
2.1.2. Chimiokines	19
2.2. Inflammation provoquée par <i>S. suis</i>	20
2.3. Composantes bactériennes impliquées dans l'activation de la réponse inflammatoire	21
2.3.1. Bactéries à Gram négatif	22
2.3.2. Bactéries à gram positif	22
2.3.2.1. L'acide lipotéichoïque (LTA)	23
2.3.2.2. Le peptidoglycane	24
2.4. Facteurs impliqués dans la reconnaissance des motifs bactériens	24
3. RECONNAISSANCE DES AGENTS INFECTIEUX : LES RÉCEPTEURS TOLL-LIKE	26
3.1. Historique : de l'endotoxine à TLR4	26
3.2. TLR et cascade signalétique	27
3.3. La superfamille des TLRs/IL-1R : structure et fonction	28
3.3.1. Le domaine Toll/IL-1R.	29
3.3.2. Domaine répétés riche en leucine (LRR)	29
3.4. Spécificité de ligands des TLRs	30
3.4.1. TLR4	30
3.4.2. TLR2	32
3.4.3. TLR5	35
3.4.4. TLR9, TLR7 et TLR8	36

3.5. Cascade signalétique de la superfamille des TLRs et IL-1Rs	37
3.5.1. MyD88	37
3.5.2. IRAKs	38
3.5.3. TRAF6	39
3.5.4. TAK1 et les TABs	39
3.5.5. NF- κ B	40
3.6. Cascades signalétiques Myd88-dépendantes et MyD88-indépendantes	40
3.7. Régulation négative de la signalisation TLR-dépendante	41
4. OBJECTIFS DU PROJET DE MAÎTRISE	42
III- MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	44
Article : <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 recognition by TLR2 confers responsiveness by human and murine macrophages	45
IV- DISCUSSION GÉNÉRALE DES RESULTATS ET CONCLUSION	84
V- BIBLIOGRAPHIE	93

LISTE DES FIGURES**MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS**

Figure 1. Expression of TLR2 (A), CD14 (B) AND TLR4 (C) mRNA after stimulation with heat-killed *S. suis* 31533 (10^9 CFU/ml), B218 (10^9 CFU/ml), LPS (50 ng/ml) or MALP-2 (10 ng/ml). 78

Figure 2. Comparative study of TLR2 (A) and CD14 (B) mRNA expression after stimulation with heat-killed *S. suis* strain 31533 (10^9 CFU/ml), unencapsulated B218 mutant (10^9 CFU/ml), purified CPS (100 μ g/ml), purified cell wall (150 μ g/ml) and MALP-2 (10 ng/ml) at 30 minutes, 8 and 24 hours. 79

Figure 3. Time course production of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-8 (D) and MCP-1 (E) by THP-1 cells (5×10^5 cells/ml) stimulated with heat-killed *S. suis* 31533 strain (10^9 CFU/ml), and unencapsulated B218 mutant (10^9 CFU/ml). 80

Figure 4. Comparative study of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-8 (D) and MCP-1 (E) production by THP-1 cells (5×10^5 cells/ml) stimulated with CPS (100 μ g/ml), cell wall (150 μ g/ml), LPS (50 ng/ml) and MALP-2 (10 ng/ml). 81

Figure 5. Effect of anti-TLR2 and anti-TLR4 MAbs on cytokine production after stimulation with heat-killed *S. suis* 31533 (10^9 CFU/ml), B218 (10^9 CFU/ml) and cell wall (150 μ g/ml). 82

Figure 6. Comparative study of IL-6 (A and C) and MCP-1 (B and D) production between TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} macrophages and wild-type macrophages after stimulation with heat-killed *S. suis* 31533 (10^9 CFU/ml), B218 (10^9 CFU/ml) and cell wall (150 μ g/ml). 83

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

BBB : Blood Brain Barrier
CFU : Colony-Forming Unit
CNS : Central nervous system
CPS : Capsule polysaccharidique
EF : Extracellular factor
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS : Fetal Bovine Serum
IL : Interleukine
IFN- γ : Interféron-gamma
LPS : Lipopolysaccharide
LTA : Lipoteichoic acid
Mabs : Monoclonal antibodies
MCP-1 : Monocytic chemotactic protein-1
MRP : muramidase-released protein
MyD : Myeloid Differentiation
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCR : Polymerase chain reaction
PGN : Peptidoglycane
PmB : Polymixin-B
RT-PCR : Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SNC : Système nerveux central
THB : Todd-Hewitt broth
TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha
TLR : Toll-Like Receptor
UFC : Unité formatrice de colonie

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet de maîtrise et plus particulièrement :

- ✓ Le docteur Marcelo Gottschalk, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire comme étudiant.

- ✓ La docteure Mariela Segura pour son aide indispensable et pour m'avoir guidée tout au long de mon projet de maîtrise. Je la remercie pour son soutien technique et ses encouragements constants.

- ✓ Tous mes collègues du laboratoire pour leurs encouragements et le plaisir que j'ai eu à les côtoyer chaque jour.

- ✓ Tous les membres du Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, pour leur implication ou leurs encouragements.

- ✓ Tous mes amis de France pour leur encouragement constant.

- ✓ Ma famille.

I- INTRODUCTION

Streptococcus suis de type capsulaire 2 est un pathogène important dans l'industrie porcine, à l'origine d'une variété d'infections chez le porc comme chez les individus travaillant en contact rapproché avec cet animal. Bien que rares, les zoonoses provoquées par cette bactérie représentent un problème majeur dans certaines zones géographiques et peuvent être une des causes principales de méningites d'origine bactérienne. Une infection à *S. suis* varie d'une bactériémie asymptomatique jusqu'à une infection fulminante similaire à celle provoquée par les bactéries à Gram négatif. De toutes les infections provoquées par *S. suis*, la méningite représente la forme la plus sévère. Elle se caractérise par la présence de fibrines, d'œdèmes et d'infiltration cellulaire au niveau des méninges et du plexus choroïdien. Récemment, une flambée épidémique de *S. suis* chez le porc et chez l'humain a été recensée en Chine, faisant état de 206 cas d'infection chez l'homme dont 38 décès. À ce jour, peu de connaissances sur les facteurs de virulence et sur la pathogénie de ces infections ont été acquises. Ainsi, de toutes les composantes bactériennes, seule la capsule polysaccharidique a été démontrée comme facteur important dans la pathogénie de *S. suis* par sa capacité de protéger la bactérie contre la phagocytose. La méningite est une inflammation des méninges dont l'altération des dynamiques du fluide cérébrospinal est due à une libération des médiateurs de la réponse inflammatoire. La compréhension des mécanismes par lesquels *S. suis* est reconnu et mène à l'activation de la réponse inflammatoire est de ce fait nécessaire. Au cours des dernières années, la découverte des récepteurs Toll-Like (TLRs) et de leur rôle dans les mécanismes de l'immunité innée a considérablement accru les connaissances sur les processus inflammatoires. Les TLRs correspondent à une famille de récepteurs impliqués, en combinaison avec des molécules adaptatrices comme le CD14, dans la reconnaissance de divers motifs exogènes et dont les interactions convergent vers l'activation du MyD88 qui active à son tour des cascades signalétiques à l'origine des mécanismes immunitaires.

Dans le but d'augmenter les connaissances sur les mécanismes impliqués au cours d'une infection causée par *S. suis*, nous nous sommes intéressés à étudier la capacité de cette bactérie à interagir avec TLR2, TLR4 et CD14, présents à la

surface de macrophages d'origines humaine et murine, et à induire la libération des médiateurs de l'inflammation associée à cette reconnaissance par des mécanismes MyD88-dépendants. Par ailleurs, du fait de l'importance des composants de surface bactériens, nous avons aussi comparé le pouvoir stimulateur pour TLR2 et TLR4 de la paroi bactérienne et de la capsule à celui de bactéries entières.

II- RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. STREPTOCOCCUS SUIS

1.1. Description

Streptococcus suis est un coque à Gram positif, hémolytique, non motile, se présentant seul, en paire ou en chaîne. Les premiers cas de septicémies chez le porc ont été décrits par de Moor au cours des années 50 et 60 sous l'appellation de streptocoques de groupes R, S, RS et T selon l'ancienne classification de Lancefield (de Moor 1963). Quelques années plus tard, Elliott suggéra que le groupe S identifié par de Moor correspondait au groupe D, à cause de la présence d'antigènes de la paroi cellulaire communs aux deux groupes et proposa alors de nommer cet isolat sous le terme de *S. suis* d'antigène capsulaire 1 (Elliott 1966). Les études qui s'en suivirent ont amené à proposer de renommer les groupes R et RS par, respectivement, *S. suis* de sérotype 2 et 1/2 (Windsor and Elliott 1975), et le groupe T par *S. suis* de sérotype 15 (Gottschalk, Higgins et al. 1989). Il aura fallu attendre finalement 1987 pour voir *S. suis* officiellement désigné comme espèce bactérienne à part entière par Kilpper-Baltz et Schleifer (Kilpper-Balz and Schleifer 1987). À ce jour, 35 sérotypes ont été identifiés mais récemment, deux sérotypes (les types capsulaires 32 et 34) ont été groupés dans l'espèce *Streptococcus orisratti* (Hill, Gottschalk et al. 2005). La majorité des isolats ont été réalisés en premier lieu chez des porcs malades à l'exception des sérotypes 14 (isolé chez l'homme), 17, 18, 19 et 21 (isolés chez des porcs sains), 20 et 31 (isolés chez des veaux malades) et du sérotype 33 (isolé chez un agneau malade) (Gottschalk, Higgins et al. 1989; Higgins, Gottschalk et al. 1995). L'habitat naturel de *S. suis* se situe dans la partie supérieure du système respiratoire (plus particulièrement au niveau des amygdales et de la cavité nasale), dans les parties génitales ainsi que dans le système digestif (Devriese, Hommez et al. 1994; Baele, Chiers et al. 2001; Cloutier, D'Allaire et al. 2003).

1.2. Prévalence et identification des différents sérotypes

De tous les sérotypes, *S. suis* de sérotype 2 est considéré le plus virulent et le plus fréquemment isolé des animaux malades. En revanche, la situation peut varier selon la localisation géographique et l'année du prélèvement. Ainsi, sur la période de 1993 à 2000, le pourcentage de *S. suis* de sérotype 2 isolés sur des animaux malades est passé de 22 à 15 % au Canada (Higgins and Gottschalk 2001). À l'inverse, près de 70 % des isolats en France correspondent au sérotype 2 (Berthelot-Herault, Morvan et al. 2000). D'autres souches appartenant à d'autres sérotypes peuvent toutefois être à l'origine d'infections sévères. C'est le cas de *S. suis* de sérotype 9 qui est majoritaire en Belgique, aux Pays-Bas et en Allemagne et pour lequel des cas de septicémies, de méningites et de pneumonies ont été reconnus chez des jeunes porcs sevrés (Wisselink, Smith et al. 2000). Le sérotype 14, quant à lui, est fréquemment associé à des cas de maladies porcines au Royaume Uni ayant les mêmes signes cliniques que ceux observés pour le sérotype 2 (Heath and Hunt 2001). *S. suis* de sérotype 2 est aussi isolé à partir d'animaux sains, toutefois les études menées à ce jour montrent que la proportion de troupeaux dans lesquels *S. suis* de sérotype 2 est présent sans observation de signes cliniques est faible (Brisebois, Charlebois et al. 1990).

Le diagnostic d'une infection causée par *S. suis* est basé sur l'observation de signes cliniques ainsi que sur l'analyse de lésions macroscopiques. Ces données doivent ensuite être confirmées par isolement de l'agent infectieux au niveau des tissus lésés. L'isolement de *S. suis* au niveau des poumons doit cependant être interprété avec précaution car cet organisme est fréquemment retrouvé au niveau du système respiratoire supérieur sans pour autant être corrélé avec une infection (Gottschalk and Segura 2000). De plus, le porc peut présenter plusieurs souches et/ou sérotypes différents de *S. suis* au niveau de la cavité nasale et des amygdales sans qu'il ne soit possible d'établir un lien de cause à effet avec le développement de pathologies. Par ailleurs, il est tout aussi possible d'isoler plusieurs sérotypes de *S. suis* chez différents animaux malades au sein d'un même troupeau.

1.3. Infections à *S. suis* chez le porc

S. suis arrive en général à la suite de l'introduction dans un élevage d'un porteur sain. Ce dernier ne représente pas le seul mode de contamination; ainsi, des objets inanimés ou d'autres espèces animales comme les insectes peuvent être considérés comme véhicules de ce pathogène (Enright, Alexander et al. 1987; MacInnes and Desrosiers 1999).

Dans un élevage infecté, les porcelets sont contaminés de manière précoce par leur mères (notamment au moment de la mise-bas ou peu après la naissance) et, après sevrage, ils contaminent à leur tour les autres individus (MacInnes and Desrosiers 1999). D'une manière générale, le stress (surpopulation, mauvaise ventilation, mauvaise hygiène, transport, regroupement d'animaux...) ou d'autres infections prédisposent à l'apparition des signes cliniques (Dee, Carlson et al. 1993; MacInnes and Desrosiers 1999).

Les maladies à *S. suis* sont particulièrement importantes chez les porcelets sevrés et chez les porcs à l'engraissement avec une expression clinique variable. Dans les formes suraiguës, les animaux sont retrouvés morts sans signe prémonitoire (Dupas, Vignon et al. 1992). Dans les formes aiguës, la maladie évolue sous forme de méningite et dans la majorité des cas on note une anorexie, un abattement, un érythème cutané, de la fièvre, une incoordination motrice, des paralysies, des tremblements, des convulsions et éventuellement de la cécité et de la surdité (Clifton-Hadley, Alexander et al. 1986). D'autres formes cliniques, comme des septicémies (notamment en porcherie d'engraissement), des arthrites (surtout chez les porcelets âgés de 2 à 5 semaines), des endocardites, des encéphalites, des pneumonies ou des abcès peuvent aussi être observées.

De plus, *S. suis* est souvent présent comme agent secondaire dans d'autres maladies comme la pleuropneumonie porcine ou le syndrome reproductif et respiratoire porcin (Thanawongnuwech, Halbur et al. 2000).

1.4. Infections à *S. suis* chez l'humain

S. suis est de plus en plus isolé chez des espèces autres que le porc, en particulier chez l'humain. Les infections causées par *S. suis* représentent majoritairement des cas de maladies professionnelles susceptibles de toucher toute personne ayant des contacts proches avec l'industrie porcine, *i.e.* des fermiers, du personnel travaillant en abattoir ou dans le transport de viande, des inspecteurs sanitaires ou des bouchers (Strangmann, Froleke et al. 2002). Depuis sa première description en 1968 au Danemark (Perch, Kristjansen et al. 1968), près de 200 cas humains ont été identifiés. *S. suis* cause majoritairement des méningites chez l'homme. Bien qu'étant considéré comme maladie occasionnelle, cette bactérie peut cependant être une des causes majeures de méningites dans certaines parties du globe (Suankratay, Intalaporn et al. 2004; Hui, Ng et al. 2005). Plus récemment, une épidémie liée à *S. suis* a été décrite. Cette-dernière, d'ampleur exceptionnelle, a été à l'origine de 204 cas humains en Chine parmi lesquels 38 ont succombés à des hémorragies sous-cutanées ou à des chocs toxiques. La quasi-totalité des cas a été corrélée avec une flambée concomitante d'infections à *S. suis* chez le porc (2005; Normile 2005).

D'autres symptômes sont reportés comme des endocardites, des arthrites, des pneumonies, ou encore des endophthalmites et des chocs septiques. Une des caractéristiques les plus marquantes lors d'une méningite provoquée par *S. suis* chez l'homme est une perte irréversible de l'audition dans 50 % des cas en Europe et dans 65 % des cas en Asie (Donsakul, Dejthevaporn et al. 2003). D'un point de vue épidémiologique, l'entrée de *S. suis* dans le corps humain peut se faire à la suite d'une lésion cutanée avec les premiers signes cliniques qui apparaissent après une période d'incubation variant de quelques heures jusqu'à deux jours (Lutticken, Temme et al. 1986).

La présence de porcs malades ne semble pas être un pré-requis à une zoonose dans la mesure où la plupart des porcs sont colonisés par cette bactérie sans pour autant présenter de signes cliniques. Toutefois, les souches isolées de cas humains sont phénotypiquement et génotypiquement proches de celles isolées chez le porc.

1.5. Facteurs de virulence

1.5.1. La capsule polysaccharidique

La présence d'une capsule polysaccharidique chez les bactéries est souvent corrélée avec des infections sévères parmi lesquelles se trouvent la septicémie, la pneumonie et la méningite (Moxon and Kroll 1990). Le rôle de la capsule dans la virulence bactérienne est un rôle protecteur contre la réponse inflammatoire de l'hôte (activation du complément et phagocytose). *S. suis* possède ainsi une capsule (CPS) polysaccharidique associée à sa membrane bactérienne (Jacques, Gottschalk et al. 1990). La CPS de *S. suis* de sérotype 2 est composé de 5 sucres, correspondant au rhamnose, au galactose, au glucose, au N-acetyl glucosamine et à l'acide N-acétylneuraminique (Elliott and Tai 1978; Katsumi, Saito et al. 1996). Bien que sa conformation ne soit pas encore établie, il a été proposé que l'acide sialique puisse être à l'origine de sa propriété antigénique (Charland, Kellens et al. 1995; Katsumi, Saito et al. 1996; Charland, Jacques et al. 1997). Cependant, comme l'ont montré Charland *et al.*, les propriétés immunogènes de la CPS sont faibles, même s'il existe des anticorps permettant l'opsonisation de la capsule de type 2 (Charland, Jacques et al. 1997). De plus, ces anticorps ne protègent que de façon partielle et sont présents en faible quantité chez les animaux convalescents (del Campo Sepulveda, Altman et al. 1996).

À ce jour, la CPS est le seul composant considéré comme critique dans la virulence de *S. suis*. En effet, l'obtention de mutants issus de souches virulentes capsulées a permis de montrer que la CPS de *S. suis* rend cette bactérie moins sensible à la phagocytose (Smith, Damman et al. 1999; Benga, Goethe et al. 2004). De plus, les souches sauvages provoquent chez le porc et chez la souris l'apparition de signes cliniques alors que les mutants non capsulés sont rapidement éliminés de la circulation (Charland, Harel et al. 1998; Smith, Damman et al. 1999). En revanche, la CPS ne peut à elle seule suffire à conférer à *S. suis* un pouvoir pathogène. En effet, Charland *et al.* ont montré qu'il est possible de trouver des souches non virulentes pourvues d'une CPS similaire en taille et en composition en acide

sialique à celle des souches virulentes (Charland, Kobisch et al. 1996). Par ailleurs, différentes souches appartenant au même type capsulaire peuvent présenter des pouvoirs pathogènes variables (Gottschalk, Higgins et al. 1991).

1.5.2. MRP (muramidase-released protein) et EF (Extracellular protein factor).

En plus de la CPS, *S. suis* possède d'autres facteurs qui peuvent participer à la virulence de cette bactérie. Deux protéines, MRP et EF, sont ainsi présentes chez certaines souches virulentes de sérotype 2 (Smith, Wisselink et al. 1997). MRP est une protéine de 136 kDa associée à la membrane bactérienne et libérée dans le milieu extracellulaire lors de la croissance bactérienne. EF, quant à elle, est une protéine de 110 kDa présente uniquement dans le surnageant de culture (Vecht, Wisselink et al. 1991). Bien que les gènes à l'origine de la synthèse de ces deux protéines aient été identifiés et clonés, la séquence en acides aminés ne permet pas d'apporter des informations concernant les fonctions putatives de ces protéines (Smith, Vecht et al. 1992; Smith, Reek et al. 1993). En revanche, une région de MRP présente des similitudes avec la protéine de *Staphylococcus aureus* liant la fibronectine mais la liaison de MRP avec la fibronectine humaine n'a pas encore été confirmée (Smith, Vecht et al. 1992).

L'implication de MRP et EF dans la pathogénicité des infections à *S. suis* demeurent incertaines. Des mutants dépourvus de l'expression de MRP et EF, et issus de souches virulentes s'avèrent toujours virulents après infection chez des porcelets axéniques (Smith, Vecht et al. 1996). Ceci suggère que la virulence de *S. suis* est un processus qui requiert l'intervention de plus d'un facteur et durant lequel une même cause peut être attribuée à différents facteurs (Smith, Wisselink et al. 1997). Il peut être aussi suggéré que la synthèse de MRP et EF puisse être corrélée avec la virulence de la souche considérée sans que pour autant ils interviennent directement dans la virulence de *S. suis*. En revanche, l'association entre la présence de MRP et EF d'une part et la virulence d'autre part ne s'observe que dans certaines régions géographiques. Ainsi, la plupart des souches nord-américaines isolées lors de cas aigus de méningites ou septicémies (d'origine humaine et

animale) sont MRP et/ou EF négatives (Gottschalk, Lebrun et al. 1998; Chatellier, Gottschalk et al. 1999).

1.5.3. Suilysine

L'activité hémolytique est souvent associée à la virulence et à la pathogénicité des espèces bactériennes. *S. suis* possède une hémolysine (la suilysine) qui correspond à une protéine de 54 kDa (Jacobs, Loeffen et al. 1994; Gottschalk, Lacouture et al. 1995). La suilysine appartient à la famille des toxines activées par pont disulfure, une famille récemment renommée toxine à activité cytolytique par fixation au cholestérol. Cette famille comprend aussi d'autres toxines parmi lesquelles se trouvent la streptolysine O, la listeriolysine, la perfringolysine et la pneumolysine (Palmer 2001). La suilysine présente des activités communes avec ces autres toxines, comme sa perte d'activité en milieu oxydant, un retour à une activité cytotoxique en milieu réducteur ou encore une inhibition en présence de cholestérol en faible quantité. Le cholestérol présent à la surface cellulaire semble être la cible privilégiée de la suilysine (Palmer 2001). Après isolement du gène *sly* et comparaison de séquences, il s'est avéré que la suilysine présente une forte similarité avec la pneumolysine de *S. pneumoniae* (Segers, Kenter et al. 1998). Alors que la majorité des hémolysines est impliquée dans la pathogénicité, il semble en revanche qu'une délétion du gène *sly* chez *S. suis* n'abolisse pas le caractère pathogène de la souche lorsqu'elle est injectée chez le porc. En revanche, l'évaluation des lésions provoquées montre que le mutant est moins virulent, suggérant ainsi que la présence de la suilysine, si elle n'est pas requise, peut avoir un rôle dans la sévérité des signes cliniques observés (Allen, Bolitho et al. 2001); il a notamment été montré que la suilysine présente une activité cytotoxique pour différentes lignées cellulaires dont les cellules endothéliales, épithéliales et phagocytaires (Norton, Rolph et al. 1999; Charland, Nizet et al. 2000; Lalonde, Segura et al. 2000; Segura and Gottschalk 2002).

Tout comme pour les protéines MRP et EF, la suilysine est majoritairement retrouvée chez les souches européennes (Gottschalk, Lebrun et al. 1998;

Okwumabua, Abdelmagid et al. 1999); en revanche, toutes les souches nord-américaines présentent des variations dans la présence de cette hémolysine. En effet, le gène *sly* n'est retrouvé que dans 7 % des isolats en Amérique du nord (Segers, Kenter et al. 1998) alors que la plupart des isolats de sérotype 2 prélevés chez des porcs malades sont de phénotype MRP+EF+Sly+ en France. Ainsi, bien que la présence de ces trois facteurs de virulence putatifs puisse être corrélée avec la pathogénicité, elle ne peut être utilisée comme marqueur de virulence chez *S. suis* (Staats, Plattner et al. 1999; Berthelot-Herault, Morvan et al. 2000; Allgaier, Goethe et al. 2001; Lun, Perez-Casal et al. 2003).

1.5.4. Autres facteurs de virulence

S. suis possède d'autres molécules susceptibles d'intervenir dans l'une des étapes d'une infection à cette bactérie. En effet, il a récemment été décrit que *S. suis* possède au moins quatre protéases dont l'activité pourrait être utile à la production de métabolites lors d'une infection à *S. suis* (Jobin and Grenier 2003). En plus de ces protéases, *S. suis* possède aussi d'autres enzymes comme une superoxyde dismutase qui lui permet de résister au stress oxydatif (Langford, Williams et al. 1991). De plus, *S. suis* a la capacité de sentir et de moduler sa quantité de fer selon les quantités présentes dans le milieu environnant (Pulliainen, Kauko et al. 2005). Enfin, plusieurs molécules, toutes impliquées dans les mécanismes d'adhérence, ont été proposées comme facteurs de virulence de *S. suis*. En effet, *S. suis* est capable d'adhérer spécifiquement à différents composants de la matrice extracellulaire (Esgleas, Lacouture et al. 2005), grâce à la présence de plusieurs molécules d'origine protéique qui favorise la colonisation des tissus par cette bactérie. Parmi ces protéines, différentes adhésines ont ainsi décrites comme des hémagglutinines (Haataja, Tikkanen et al. 1993; Tikkanen, Haataja et al. 1996), une protéine fixant l'albumine (Quessy, Busque et al. 1997), une protéine liant les IgG (Serhir, Higgins et al. 1993), une protéine liant la fibronectine (de Greeff, Buys et al. 2002), ainsi qu'une glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Brassard,

Gottschalk et al. 2004), toutes susceptibles d'intervenir dans l'une des étapes de l'infection. En revanche, leur rôle précis reste encore à être confirmé.

1.6. Étapes dans le développement d'une méningite associée à *S. suis*

La pathogénèse des infections à *S. suis* est encore aujourd'hui incertaine. En effet, les études menées concernent majoritairement le sérotype 2 dans des cas de méningites. Il est communément admis que les porcelets sont infestés lors de la mise à bas mais peuvent aussi être infectés par proximité avec les truies, les faeces ou toutes autres surfaces souillées (Gottschalk and Segura 2000). Une fois introduite, la bactérie colonise alors les amygdales. Si certains animaux ne développent jamais de maladies (demeurant ainsi à l'état de porteurs sains), d'autres en revanche développent tôt ou tard une bactériémie, parfois une septicémie, voire une méningite. Dans ce dernier cas, les bactéries doivent atteindre le système circulatoire et être véhiculées jusqu'au système nerveux central.

1.6.1. Voie d'entrée de *S. suis*

La première question posée est comment un faible inoculum présent au niveau des surfaces des muqueuses peut traverser les premières barrières et développer la maladie. En fait, ces bactéries doivent franchir l'épithélium au niveau du système respiratoire supérieur. Peu d'études ont été réalisées pour comprendre les interactions de *S. suis* avec les cellules épithéliales. Il a cependant été montré que les souches virulentes de *S. suis* envahissent une lignée de cellules épithéliales d'origine humaine (Norton, Rolph et al. 1999). De plus, il a été aussi montré que la présence de suilysine rend *S. suis* cytotoxique pour cette lignée humaine ainsi que pour des cellules d'origine porcine (Lalonde, Segura et al. 2000) et que des anticorps monoclonaux anti-*S. suis* inhibent cette toxicité. Norton *et al.* ont suggéré que certaines souches de *S. suis* peuvent envahir tout comme causer une lyse cellulaire et éviter ainsi une activation des cellules épithéliales (Norton, Rolph et al. 1999). En ce qui concerne les souches suilysine-négatives, elles ne semblent pas

être cytotoxiques pour les cellules épithéliales sans pour autant qu'il ait été montré qu'elles puissent envahir ce type de cellules. En effet, Lalonde *et al.* ont été dans l'incapacité d'observer une quelconque invasion de *S. suis* pour différentes lignées de cellules épithéliales d'origine humaines et animales dont le porc (Lalonde, Segura et al. 2000). C'est la raison pour laquelle Norton *et al.* ont suggéré que le phénomène d'invasion observé peut être considéré comme un événement rare. Récemment, une étude basée sur la comparaison du pouvoir invasif de souches non typables et de souches de sérotype 2 a montré qu'il existe des variations importantes dans la capacité à envahir plusieurs lignées de cellules épithéliales (Benga, Goethe et al. 2004). En revanche, ces différences ne sont pas corrélées avec la virulence des souches considérées mais semblent être liés d'une part à la présence de la CPS et peuvent varier selon les conditions environnementales. De plus, plusieurs mécanismes d'invasion sont envisageables et la capacité à survivre au pH acide des phagosomes et des lysosomes dépendrait de l'expression d'une arginine déiminase (Benga, Goethe et al. 2004). Si l'invasion reste encore incertaine, il paraît cependant intéressant d'observer l'adhérence de différentes souches de *S. suis* sur différentes lignées cellulaires (Lalonde, Segura et al. 2000). Cette adhérence incrimine majoritairement la paroi bactérienne et est réduite en présence de la CPS (Benga, Goethe et al. 2004). En revanche, cette capsule ne semble pas interférer dans le cas de cellules endothéliales de microvaisseaux (Charland, Nizet et al. 2000). St Gemme et Cutter ont suggéré que la présence de capsule peut être modulée selon l'étape de l'infection (St Geme and Cutter 1996). Ce faisant, l'épaisseur de la capsule pourrait être diminuée lorsque la bactérie se trouve en contact avec les cellules épithéliales du système respiratoire et sa synthèse se retrouverait activée au niveau du système circulatoire afin de protéger la bactérie du système immunitaire. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que *S. suis* produit plus de polysaccharides capsulaires *in vivo* qu'*in vitro* (Charland, Kobisch et al. 1996). Par conséquent, *S. suis* a acquis la capacité à moduler l'expression des polysaccharides capsulaires selon son environnement.

1.6.2. Dissémination de *S. suis* dans l'organisme

Le deuxième point à éclairer concerne les mécanismes opérés par *S. suis* pour se disséminer dans le système sanguin. Une ancienne théorie, dite du cheval de Troie, suggère que *S. suis* est acheminé au système nerveux central (SNC) par association avec des monocytes. Cette association implique la capacité de *S. suis* à survivre à l'intérieur de ces cellules. Par ailleurs, elle pourrait se faire, soit directement au niveau des amygdales, soit une fois que la bactérie ait atteint la circulation (Williams and Blakemore 1990). En revanche, d'autres études plus récentes suggèrent que *S. suis* utilise d'autres mécanismes. Ainsi, même si une faible activité phagocytaire est observée, la majorité des bactéries sont trouvées dans le milieu extracellulaire. En effet, le pourcentage de monocytes à l'intérieur desquels *S. suis* est retrouvé est de l'ordre de 2 % lors d'une bactériémie chez le porc (Williams and Blakemore 1990). Par ailleurs, Segura *et al.* ont récemment montré que la présence de la CPS est défavorable à l'activation des kinases à sérine et thréonine Akt et PKC α , toutes deux impliquées dans les processus de réarrangements du cytosquelette ou dans l'activation des macrophages (Segura, Gottschalk et al. 2004). Ainsi, la présence d'une CPS ayant des propriétés antiphagocytaires favoriserait une circulation libre de *S. suis* au niveau du système sanguin ou associé à la surface des macrophages sans être phagocyté (Gottschalk and Segura 2000), selon une théorie intermédiaire dite théorie du cheval de Troie modifiée.

1.6.3. Entrée de *S. suis* dans le système nerveux central

Le troisième point important concerne le passage du système circulatoire à l'espace sous-arachnoïdien et les mécanismes de traversée de la barrière hémato-encéphalique (BBB pour « Blood-brain barrier »). Dans l'éventualité où la théorie du cheval de Troie (ou modifiée) s'avèrerait exacte, *S. suis* pourrait atteindre la BBB, soit à l'intérieur, soit en association avec les monocytes. En réalité, Williams et Blakemore ont trouvé des bactéries à l'intérieur du plexus choroïdien ainsi que dans des monocytes lors de bactériémies chez le porc (Williams and Blakemore

1990). Dans la mesure où le SNC est considéré comme un organe privilégié d'un point de vue immunologique, la circulation de monocytes à l'intérieur du SNC demeure controversée. En revanche, il est admis que le statut immunoprivilégié du cerveau n'est pas absolu tout comme sa perméabilité aux cellules immunes peut varier selon certaines conditions.

La plupart des pathogènes à l'origine de méningites, comme *S. pneumoniae*, *Escherichia coli* K1 et les streptocoques du groupe B peuvent interagir directement avec les cellules de la BBB (Tuomanen 1996). Cette barrière se caractérise par la présence de jonctions serrées et permet de réguler le trafic de fluides, de macromolécules, voire de cellules, de part et d'autres de cette couche. Deux sortes de cellules présentent ce type de jonctions serrées : d'une part les cellules endothéliales des microvaisseaux du cerveau BMECs (« brain microvascular endothelial cell ») et, d'autre part, les cellules épithéliales formant le plexus choroïdien (Tuomanen 1996). Ainsi, il est communément accepté que l'interaction d'une bactérie avec les BMECs entraîne l'adhérence de cette bactérie, son invasion et sa toxicité ou une augmentation de la perméabilité de la BBB. Une étude a montré que *S. suis*, à la différence d'autres espèces bactériennes, est capable d'adhérer mais pas d'envahir les BMECs d'origine humaine (Charland, Nizet et al. 2000). Il est donc possible que *S. suis* adhère aux cellules BMECs puis ensuite affecte l'intégrité de cette barrière physique. Les événements varient cependant selon l'origine animale des cellules. En effet, contrairement aux BMECs d'origine humaine, Vanier *et al.* ont montré que *S. suis* adhère et envahit les BMECs d'origine porcine (Vanier, Segura et al. 2004). En plus de la cytotoxicité des souches suilysine-positives, il semble que *S. suis* puisse traverser la BBB par au moins deux mécanismes distincts : d'une part en envahissant les cellules formant cette barrière et, d'autres part, en altérant l'intégrité de la BBB. Ce faisant, ces facteurs permettent dès lors d'augmenter la perméabilité de la BBB et provoquent des oedèmes cérébraux, une augmentation de la pression intracrânienne et un arrêt de la circulation sanguine au niveau du cerveau, caractéristique d'une méningite bactérienne. En effet, les observations histopathophysiologiques indiquent la présence de nécrose au niveau de la paroi des vaisseaux, associée à des agglomérats

de cellules pro-inflammatoires (Sanford 1987). Partant de ce principe, il paraît important de distinguer le cas des méningites provoquées par des souches européennes de celles induites par des souches nord-américaines (respectivement suilysine positives et suilysine négatives). En effet, la pathogénie des méningites peut différer selon la souche qui a induit l'infection. Ainsi, la suilysine peut altérer l'intégrité des BMECs, contribuant par la même occasion à augmenter la perméabilité de la BBB (Charland, Nizet et al. 2000). D'un autre côté, l'adhérence des souches suilysine-négatives aux BMECs peut avoir des conséquences autres que sur la viabilité des BMECs. Ainsi, Vadeboncoeur *et al.* ont montré que les BMECs libèrent des cytokines pro-inflammatoires en forte quantité suite à la stimulation par *S. suis* (Vadeboncoeur, Segura et al. 2003). De plus, Adam *et al.* ont montré que l'entrée de *S. suis* au niveau du SNC provoque chez le porc l'activation des cellules épithéliales du plexus choroïdien qui libèrent alors des cytokines pro-inflammatoires, créant ainsi un microenvironnement défavorable à la colonisation de *S. suis* (Adam, Tenenbaum et al. 2004). Il paraît de ce fait important de mieux connaître le rôle de ces cytokines dans l'intégrité de la BBB lors d'une infection à *S. suis*.

1.6.4. Activation des cellules par *S. suis*

Quels que soient les mécanismes d'entrée de *S. suis* dans le SNC, l'activation du système immunitaire joue un rôle important dans la pathogenèse d'une infection à *S. suis*. En effet, si l'on considère la théorie du cheval de Troie ou sa résultante, la libération de cytokines par des cellules phagocytaires activées peut en retour activer les cellules endothéliales et augmenter par la même occasion le trafic des cellules de la réponse immune ainsi que la circulation des bactéries associées. Si, en revanche, on considère des bactéries en circulation libre, ces dernières peuvent directement ou indirectement activer l'expression des molécules d'adhésion ainsi que la migration des leucocytes non-infectés au travers de la BBB. Dans ce cas, les leucocytes ouvrent une voie de passage pour *S. suis* vers le SNC (Gottschalk and Segura 2000).

2. PATHOPHYSIOLOGIE DU CHOC SEPTIQUE

La réaction normale d'une infection implique une série de processus immuns complexes. Une cascade immunologique appropriée assure une prompt réponse protectrice chez l'hôte contre l'entrée d'un corps étranger. À l'inverse, une déficience dans les mécanismes de défense permet à l'infection de s'établir; de même, un excès ou une libération mal adaptée de composants induisant une réaction inflammatoire peut nuire à l'hôte (Tsiotou and Sakorafas 2004). La septicémie résulte d'un déclenchement intensif des mécanismes de défense suite à l'entrée d'un microorganisme ou à des lésions tissulaires. Ces mécanismes de défense comprennent la libération de cytokines, l'activation des neutrophiles, des monocytes, des cellules endothéliales des microvaisseaux ainsi que l'activation de neuroendocrines et des protéines du plasma (tel que le complément).

Les monocytes représentent les cellules clefs de reconnaissance chez l'homme (Tsiotou and Sakorafas 2004). En effet, elles sont parmi les premières cellules phagocytaires à venir en contact avec les pathogènes. Ils jouent donc un rôle critique dans la régulation de la réponse inflammatoire après l'entrée d'un pathogène (Baker and Huynh 1995; Evans 1996). Ces cellules exercent divers effets cellulaires menant à la libération des cytokines (Evans 1996). En revanche, lors d'une stimulation excessive de ces cellules, ils peuvent alors libérer des quantités excessives et non régulées de médiateurs pro-inflammatoires qui augmentent à leur tour la réponse inflammatoire de façon synergique (Casey 2000; Calandra, Bochud et al. 2002).

2.1. Médiateurs de l'inflammation

2.1.1. Cytokines

Les cytokines sont en effet des médiateurs essentiels de la réponse inflammatoire observée lors de septicémie ou de choc septique. Elles peuvent être divisées en deux catégories : d'une part les cytokines pro-inflammatoires (tels que

TNF- α , IL-1, et IL-6) et, d'autre part, les cytokines anti-inflammatoires (par exemple IL-10) (Tsiotou and Sakorafas 2004).

TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) est l'une des plus importantes cytokines impliquées dans la pathophysiologie de la septicémie (Tsiotou and Sakorafas 2004). Cette cytokine, libérée de façon précoce, induit des lésions tissulaires surtout par sa capacité de stimuler les neutrophiles qui, à leur tour, répondent en libérant des élastases, des ions superoxyde, du peroxide d'hydrogène, des PAF (platelet-activating-factor) des leukotriènes ou du thromboxane (Aldridge 2002).

IL-1 stimule aussi la synthèse de prostaglandines, d'élastases et de collagénase. De plus elle favorise la migration transendothéliale des neutrophiles et active les cellules endothéliales des microvaisseaux. Ainsi, IL-1 et TNF- α agissent en synergie et partagent plusieurs effets biologiques observés lors de septicémie (Tsiotou and Sakorafas 2004).

IL-6 joue quant à elle des rôles opposés. En effet, cette cytokine peut être considérée comme une cytokine anti-inflammatoire dans la mesure où elle inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires et induit la synthèse de protéines de la phase précoce qui jouent en défaveur de l'inflammation (Tsiotou and Sakorafas 2004). Elle peut cependant être vue aussi comme facteur aggravant lors de septicémie par sa contribution dans l'activation du pouvoir cytotoxique des neutrophiles (Johnson, Moore et al. 1998). Ainsi, il a été proposé qu'IL-6 pouvait être toxique lorsqu'elle est produite simultanément avec d'autres cytokines (Casey 2000).

2.1.2. Chimiokines

Les chimiokines correspondent à un groupe de molécules majoritairement basiques et structurellement reliées entre elles qui comprend plus de 40 membres. Elles peuvent être divisées en quatre sous-familles, i.e. CXC, CC, C et CX₃C, selon l'arrangement des deux premiers résidus cystéines. Les chimiokines sont impliquées dans la régulation du trafic de divers types de leucocytes et jouent un rôle fondamental dans le développement et le bon fonctionnement du système

immunitaire. Elles présentent des effets dans le SNC ainsi que sur les cellules endothéliales impliquées dans l'angiogénèse. IL-8 est une chimiokine de type CXC qui favorise la migration des neutrophiles au site de l'inflammation (Baggiolini, Dewald et al. 1994). Cette cytokine cause l'activation de la motilité des neutrophiles ainsi que l'expression de molécules de surface (Baggiolini, Dewald et al. 1994; Baggiolini 1995). MCP-1 (« monocyte chemotactic protein-1 ») est une chimiokine de type CC qui a la capacité de recruter des monocytes, des cellules dendritiques et des microglia au site de l'infection (Gangur, Birmingham et al. 2002). Ces deux chimiokines sont de plus retrouvées dans des cas de méningites d'origine bactérienne.

2.2. Inflammation provoquée par *S. suis*

Au niveau du SNC, les cytokines sont impliquées dans le processus d'inflammation des méninges causées par des bactéries, comme les streptocoques du groupe B (Cuzzola, Mancuso et al. 2000) et *Streptococcus pneumoniae* (Ring, Weiser et al. 1998). Elles provoquent alors une altération des dynamiques du fluide cérébrospinal, du métabolisme du cerveau ainsi que du contrôle du flux sanguin (Cavaillon, Muller-Alouf et al. 1997). De ce fait, l'induction de cytokines chez des monocytes ou macrophages lors d'une infection à *S. suis* pourrait jouer un rôle dans le développement de la septicémie tout comme celui de la méningite provoquée par cette bactérie (Gottschalk et Segura 2000). Des études *in vitro* ont ainsi montré que *S. suis* induit l'activation des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 chez la lignée de macrophages murins J774A1 (Segura, Stankova et al. 1999). De plus, il a été montré que la paroi bactérienne est une des composantes responsables de la stimulation de cytokines (Segura, Stankova et al. 1999). Ainsi, cette composante de surface serait à l'origine de l'induction d'une réponse inflammatoire et la capsule nécessaire à l'adhérence et à l'éviction d'une activité phagocytaire (Segura et Gottschalk 2002). D'autres études réalisées à l'aide de la lignée THP-1 de monocytes humains ont montré que *S. suis* induit la production de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et de MCP-1 (Segura, Vadeboncoeur et al. 2002). En utilisant des

anticorps neutralisants anti-TNF- α et anti-IL-1 β , il a été mis en évidence que TNF- α et IL-1 β étaient impliquées dans l'amplification de la cascade d'induction provoquée par *S. suis*, menant ainsi à une plus grande production d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 (Segura, Vadeboncoeur et al. 2002). Chez cette même lignée humaine, il a été aussi montré que *S. suis* était impliqué dans l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, CD11a/CD18 et CD11c/CD18. La composante bactérienne responsable de cette induction serait la paroi bactérienne (Al-Numani, Segura et al. 2003).

Peu de données sont en revanche disponibles concernant les mécanismes de reconnaissance et les récepteurs utilisés par *S. suis* pour induire l'activation des cellules phagocytaires. Jusqu'à présent, le CD14 est le seul récepteur ayant été identifié comme étant partiellement impliqué dans la production de TNF- α , IL-1 β , IL-6 et MCP-1. En revanche, pour IL-8, d'autres voies CD14-indépendantes interviendraient à la suite de la stimulation des monocytes THP-1 par *S. suis* (Segura, Vadeboncoeur et al. 2002).

2.3. Composantes bactériennes impliquées dans l'activation de la réponse inflammatoire

Les interactions entre un microorganisme et les cellules de l'hôte correspondent à une succession linéaire d'événements au cours desquels l'organisme exogène induit chez l'hôte la production de cytokines. En revanche, les microorganismes peuvent aussi détourner à leur avantage les cytokines produites. Des études récentes montrent que certains pathogènes produisent des molécules menant à l'induction de cytokines pro- ou anti-inflammatoires ayant pour conséquence de rendre incapable l'hôte de donner une réponse appropriée à l'éradication du pathogène (Henderson, Poole et al. 1996). Wilson *et al.* (Wilson, Seymour et al. 1998) ont proposé que la capacité de certaines composantes bactériennes d'induire la libération des cytokines chez l'hôte peut être considérée comme un des aspects de la virulence bactérienne quand cette réponse provoque une pathologie due à son intensité et/ou sa chronicité.

2.3.1. Bactéries à Gram négatif

Les composants de surface des bactéries à Gram négatif forment une structure extrêmement complexe constituée d'une membrane interne, d'un espace périplasmique contenant du peptidoglycane (PGN), et d'une membrane externe renfermant des protéines dites de la membrane externe ainsi que d'une molécule amphiphile, le lipopolysaccharide (LPS) (Miller, Ernst et al. 2005). Le LPS est un des composants bactériens les plus importants ayant un potentiel de stimulation de la réponse immune et du déclenchement d'une réaction inflammatoire. Il est en grande partie responsable de l'induction de la réponse inflammatoire associée à une septicémie provoquée par une bactérie à Gram négatif (Beutler and Rietschel 2003).

Le LPS est composé de trois parties. L'antigène O correspond à la partie la plus éloignée de la surface bactérienne et est constitué d'une répétition de sous-unités carbonées. A ceci suit la région centrale du LPS (région core) à l'intérieur duquel on distingue le noyau interne du noyau externe. Selon l'organisme, le noyau externe varie au niveau structural; en revanche, le noyau interne est constitué d'une structure plus conservée qui se caractérise par la présence notamment d'acide 2-keto-3-deoxyoctonique (KDO) (Raetz and Whitfield 2002). Enfin, la partie interne du LPS est constituée du lipide A, assurant une association étroite avec les protéines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Raetz and Whitfield 2002). Selon les études menées sur les propriétés d'endotoxine du LPS, il est communément admis que le lipide A est la partie responsable de l'activité toxique du LPS, à cause de ces résidus riche en acide gras (Henderson, Poole et al. 1996; Henderson, Poole et al. 1996).

2.3.2. Bactéries à Gram positif

Bien qu'il est connu depuis des décennies que les bactéries à Gram positif induisent la synthèse de cytokines, les composantes bactériennes responsables de cette induction sont demeurées inconnues (Henderson, Poole et al. 1996). Si la

surface cellulaire des bactéries à Gram positif et négatif est similaire, la structure de la paroi entre ces deux catégories d'organismes diffère de façon considérable. Ainsi, la paroi des bactéries à Gram positif est constituée d'une couche épaisse de PGN, d'acide lipoteichoïque (LTA) et d'un nombre varié de protéines. Chacune de ces molécules peut être impliquée dans l'activation des systèmes de défense de l'hôte menant à l'inflammation (Verhoef and Mattsson 1995; Glauser 1996).

2.3.2.1. L'Acide lipoteichoïque (LTA)

Le LTA est une molécule amphiphile constituée d'un polymère polyanionique hydrophile exposée à la surface de la bactérie et d'une région hydrophobe correspondant généralement à un glycolipide, lié de façon covalente à ce polymère et qui permet d'ancrer cette molécule à la membrane bactérienne. Le LTA peut être considéré comme un facteur de virulence à cause de sa capacité de stimuler une réponse inflammatoire. Il peut être considéré comme l'équivalent du LPS des bactéries à Gram négatif, bien qu'ayant un pouvoir de stimulation bien plus faible que ce dernier (Henderson, Poole et al. 1996). En revanche, des préparations de bactéries entières ont un potentiel de stimulation supérieur aux composantes purifiées, suggérant que le PGN et le LTA peuvent agir en synergie afin de causer le choc septique (De Kimpe, Kengatharan et al. 1995). Bien que la majorité des pathogènes à Gram positif soient recouverts d'une capsule polysaccharidique, la paroi bactérienne conserve un potentiel d'interaction avec les cellules hôtes comme il a été démontré avec des composantes de la phase aiguë telles les molécules du complément. Ainsi la paroi bactérienne est une structure dynamique dont les composantes sont perpétuellement insérées et relâchées hors de la bactérie. De plus, les composants de la paroi bactérienne ayant subi une dégradation enzymatique sont des facteurs à pouvoir chimiotactique plus important que s'ils restent intacts à la surface bactérienne, comme il a été observé lors de traitement aux antibiotiques provoquant une lyse bactérienne (Tuomanen, Austrian et al. 1995).

2.3.2.2. Le peptidoglycane

Le PGN est un composant essentiel de la paroi cellulaire de toutes les bactéries. Il correspond à un polymère constitué de N-acétylglucosamine lié à de l'acide N-acétylmuramique par liaison $\beta(1-4)$, cette chaîne est généralement N-acétylée et parfois aussi O-acétylée (Schleifer and Kandler 1972; Dziarski 2003). Cette séquence polymérique est aussi ornée de petits peptides constitués d'acides aminés de configuration L alternés avec d'autres de configuration D. Chez les bactéries à Gram positif, sa longueur et sa composition en acides aminés varient selon l'espèce considérée (Schleifer and Kandler 1972). Le PGN entoure la membrane des bactéries et permet de maintenir sa forme ainsi que de supporter la pression osmotique. Le PGN est particulièrement abondant chez les bactéries à Gram positif pour lesquelles il compte pour près de la moitié de la masse totale de la paroi, formant ainsi une couche épaisse par ses liaisons multiples avec des glycolipides et des protéines (Schleifer and Kandler 1972). Chez les bactéries à Gram négatif, le PGN est retrouvé sous forme d'une couche mince au niveau du périplasme (Schleifer and Kandler 1972; Rosenthal and Dziarski 1994). Puisque le PGN se trouve exposé à l'extérieur des bactéries à Gram positif et qu'il n'est pas retrouvé chez les cellules eucaryotes, il est une cible de reconnaissance privilégiée pour le système immunitaire de l'hôte.

2.4. Facteurs impliqués dans la reconnaissance des motifs bactériens

Une étape majeure dans la compréhension des mécanismes inflammatoires impliqués lors d'une infection à une bactérie à Gram négatif a été réalisée quand il a été compris que le LPS ne présente pas d'activité biologique *per se*. En effet, ce n'est qu'une fois complexé avec des facteurs de l'hôte qu'il acquiert son potentiel biologique. Le LPS présente des domaines de fixation à divers protéines de l'hôte dont les plus importantes sont CD14 et LBP (« LPS-binding-protein ») (Wright, Ramos et al. 1990; Couturier, Haeffner-Cavaillon et al. 1991; Henderson, Poole et al. 1996; Henderson, Poole et al. 1996). Le CD14 est une protéine de 55 kDa,

retrouvée, soit attachée à la membrane des monocytes et PMNs via un groupement glycosylphosphatidylinositol (mCD14), soit sous forme soluble en quantité importante dans le plasma (sCD14). La LBP est une glycoprotéine de 60 kDa synthétisée par les hépatocytes et présente dans le sérum qui joue le rôle d'opsonine pour les bactéries à Gram négatif (Wright, Ramos et al. 1990). Cette protéine se lie avec une forte affinité au lipide A du LPS qui à son tour favorise la liaison du LPS au CD14. Ce n'est qu'une fois fixé au CD14 que l'on observe une augmentation du pouvoir endotoxique du LPS. Le sCD14, associé au complexe LBP-LPS, confère aux cellules n'exprimant pas la forme membranaire de CD14 la capacité de répondre au LPS (Pugin, Schurer-Maly et al. 1993). La région se liant au LPS a été identifiée et correspond aux 152 acides aminés en partie N-terminale, plus précisément entre les acides aminés 51 et 64 (Dziarski, Tapping et al. 1998).

Le CD14 à lui seul est incapable d'induire un signal intracellulaire. En revanche, sa neutralisation par des anticorps inhibe aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* le pouvoir stimulateur du LPS (Wright 1995; Leturcq, Moriarty et al. 1996). Il a été ainsi suggéré que la fonction du CD14 est de se lier et d'amplifier la réponse au LPS par des mécanismes multifactoriels faisant intervenir d'autres récepteurs situés à la surface des cellules (Ulevitch and Tobias 1994). De plus, pour de fortes doses de LPS, d'autres mécanismes d'activation cellulaire ont été aussi proposés (Couturier, Jahns et al. 1992; Lynn, Liu et al. 1993; Ingalls et Golenbock 1995; Glauser 1996). Bien que la composition des parois diffère pour deux espèces bactériennes données, les réactions de l'hôte suite à l'invasion de ces deux organismes sont paradoxalement similaires. Ainsi, des mécanismes d'activation cellulaire communs aux bactéries à Gram positif et négatif ont été proposés. En plus de sa forte affinité pour le LPS, le CD14 est aussi impliqué dans la réponse à des bactéries à Gram positif et à leurs produits dérivés dont le PGN et le LTA de plusieurs streptocoques (Wright 1995; Dziarski, Ulmer et al. 2000). À cause de son rôle dans la réponse cellulaire pour différents composants bactériens, le CD14 a été qualifié de récepteur de reconnaissance par Pugin *et al.* (Pugin, Heumann et al. 1994). Bien qu'il manque de spécificité dans la reconnaissance des composantes bactériennes, l'interaction

avec d'autre(s) molécule(s) expliquerait cette spécificité dans la réponse cellulaire (Wright 1995).

3. RECONNAISSANCE DES AGENTS INFECTIEUX : LES RÉCEPTEURS TOLL-LIKE

3.1. Historique : de l'endotoxine à TLR4

Le terme d'endotoxine a été employé pour la première fois par Richard Pfeiffer lorsqu'il identifia une composante qui, injectée simultanément à des préparations de *Vibrio cholerae* (ou d'autres organismes neutralisés à l'aide d'anticorps) provoquait chez des animaux l'apparition de fièvre et de choc septique. Jusqu'à la fin de sa carrière, il a ignoré que les antigènes O des bactéries à Gram négatif sont attachés à cette substance qu'il a qualifiée d'endotoxine (Rietschel and Cavaillon 2002; Rietschel and Cavaillon 2002). Il a fallu attendre Boivin, Staub, Lüderitz et collaborateurs pour démontrer que le LPS est la principale composante responsable des effets observés (Boivin and Mesrobian 1935; Luderitz, Staub et al. 1966). L'endotoxine est devenue alors une toxine à caractériser en termes mécanistiques. L'une des premières approches a consisté à comprendre en détail les effets de l'endotoxine sur les mammifères. Tout comme l'a observé Pfeiffer, une grande partie de la toxicité des bactéries à Gram négatif peut être attribuée à l'endotoxine elle-même. Pfeiffer a ainsi noté la présence d'activité endotoxique chez des bactéries à Gram positif, prédisant la similarité des effets biologiques attribués à l'endotoxine *sensu stricto* et d'autres composantes d'origine microbienne comme le peptidoglycane, les lipopeptides et les séquences d'ADN non méthylées.

L'une des majeures avancées dans la compréhension du pouvoir endotoxique du LPS a été concrétisée en 1965 par des approches génétiques. Ainsi, des chercheurs ont observé que la lignée de souris C3H/HeJ est fortement résistante aux effets biologiques du LPS (Heppner and D.W. 1965). Par ailleurs, d'autres toxines bactériennes provoquent toujours une réponse normale chez cette lignée, montrant ainsi que ce phénotype est spécifique au LPS et en 1977, Watson *et al.* ont démontré qu'un seul gène était impliqué dans cette différence phénotypique

(Watson, Riblet et al. 1977). Ainsi, aussi complexe que soit l'interaction entre le LPS et les cellules et protéines de l'hôte, le produit d'un seul gène est requis pour expliquer la toxicité du LPS, suggérant fortement qu'un seul récepteur est impliqué dans la reconnaissance du LPS. De plus, il est apparu sans ambiguïté que le LPS est reconnu de manière intentionnelle. Cette reconnaissance représente donc un avantage certain pour l'hôte et est nécessaire pour éliminer efficacement l'intrusion d'une bactérie à Gram négatif. Ces conclusions ont amené d'autres questions : pourquoi les mécanismes de l'hôte maintiennent-ils un système pouvant produire de tels dommages et quel avantage a-t-il à reconnaître la présence de LPS ? Ainsi, il s'est avéré que la reconnaissance du LPS est un mécanisme avantageux dans le cas de faibles inocula bactériens. À la suite de cette découverte, il s'en est suivit plusieurs études qui ont mené vers la fin des années 1990 à la localisation de la mutation chez la lignée C3H/HeJ et à l'identification de TLR4 comme étant la protéine impliquée dans cette reconnaissance (Poltorak, He et al. 1998; Poltorak, Smirnova et al. 1998).

3.2. TLR et cascade signalétique

Tout organisme est exposé continuellement à des microorganismes présents dans l'environnement et doit se prévenir de leur éventuelle invasion. Chez les vertébrés, la réponse immune se divise en immunité innée et immunité adaptée, avec l'immunité innée comme première ligne de défense contre d'éventuels pathogènes. À l'opposé, la réponse immunitaire adaptée correspond à un processus plus long et implique l'intervention des lymphocytes T et B, tous les deux possédant des récepteurs générés à la suite des réarrangements de la séquence génomique qui leur permettent de répondre à un large éventail d'antigènes. Ce système de détection d'antigènes excessivement complexe est trouvé uniquement chez les vertébrés et a fait l'objet de recherches particulièrement approfondies, laissant de côté l'intérêt que l'immunité innée peut susciter. En effet, les mécanismes liés à la réponse innée a pendant très longtemps été considéré comme un système relativement peu spécifique dont le rôle consiste sommairement à

détruire les pathogènes et à présenter les antigènes aux cellules intervenant lors de l'immunité adaptée. Cependant, des études récentes ont montré que les mécanismes liés à la réponse innée sont plus spécifiques et qu'ils correspondent à des mécanismes communs aux règnes végétal et animal ayant divergé d'un point de vue évolutif jusqu'à différencier le soi du non soi chez les mammifères. Cette discrimination dépend d'une famille de récepteurs fortement conservés et identifiés comme les « Toll-Like Receptors » (TLRs). Les TLRs jouent un rôle crucial dans les mécanismes de défense précoce de l'hôte face à l'entrée d'un pathogène (Janeway et Medzhitov 2002; Beutler et Rietschel 2003). De plus, plusieurs études montrent que l'activation du système immunitaire innée est un pré-requis à l'activation de l'immunité spécifique (Akira, Takeda et al. 2001; Medzhitov 2001). Cette évolution dans la façon d'envisager l'immunité a profondément changé la vision communément admise de la pathogénie ainsi que dans le traitement d'autres maladies tels les cancers, l'autoimmunité ou encore les allergies. De ce fait, la compréhension des mécanismes de signalisation par les TLRs a suscité un intérêt croissant qui a abouti à une meilleure compréhension des mécanismes de l'immunité.

3.3. La superfamille des TLRs/IL-1R : structure et fonction

La découverte de la famille des TLRs commence par l'identification de la protéine Toll, qui est un récepteur exprimé chez les insectes et à rôle essentiel dans l'établissement de la polarité dorso-ventrale lors de l'embryogénèse (Hashimoto, Hudson et al. 1988). Suite à cette découverte, d'autres études ont montré que Toll est aussi impliqué dans les mécanismes d'immunité innée chez l'imago, en réponse aux infections causées par les champignons (Lemaitre, Nicolas et al. 1996) et les bactéries à Gram positif (Lemaitre 2004). Par comparaison de séquences, il a été ensuite possible d'identifier l'existence de protéines homologues à Toll chez des mammifères. À ce jour, 11 membres de la famille des TLRs sont connus chez l'humain. Les TLRs correspondent à des glycoprotéines membranaires de type I et, du fait de la forte homologie de leur domaine cytoplasmique, ils sont groupés au

sein de la même famille que celle des récepteurs à l'interleukine-1 (IL-1Rs). En revanche, le domaine extracellulaire des TLRs n'est nullement apparenté à celui des IL-1Rs et est constitué de motifs répétés riches en leucine (LRR, leucine-rich repeat), alors que celui des IL-1Rs présente trois domaines similaires à des immunoglobulines.

3.3.1. Le domaine Toll/IL-1R.

Les TLRs et les IL-1Rs présentent une région conservée d'environ 200 acides aminés dans leur partie cytoplasmique qualifiée de domaine TIR (Toll/IL-1R) (Slack, Schooley et al. 2000). Ce domaine comprend trois boîtes conservées jouant un rôle crucial dans les mécanismes de signalisation. La séquence en acides aminés est fortement conservée parmi les différents domaines TIR (de l'ordre de 20-30%) mais peut varier en taille. Par cristallographie, il a été montré que le domaine TIR des TLR1 et 2 humains est constitué d'un tonneau β formé de 5 chaînes parallèles, entourées par 5 hélices α (Xu, Tao et al. 2000). Ces deux structures secondaires sont liées entre elles par des boucles. De plus, ces boîtes sont adjacentes et exposées de façon à interagir avec d'autres molécules adaptatrices.

En ce qui concerne les souris C3H/HeJ, leur incapacité à répondre à la stimulation par le LPS s'explique par une mutation au niveau d'une des chaînes reliant deux boîtes du domaine TIR de TLR4 (Poltorak, He et al. 1998). La structure secondaire reste de ce fait inchangée mais l'éloignement d'une des boîtes empêche le contact du domaine TIR avec une ou plusieurs autres molécules présentant elles aussi un domaine TIR.

3.3.2. Domaine répétés riche en leucine (LRR)

Le domaine extracellulaire des TLRs contient de 19 à 25 copies en tandem du motif LRR. Chacune de ces répétitions est elle-même constituée de 24 à 29 acides aminés (Bell, Mullen et al. 2003). Ces répétitions se présentent sous la forme d'un tonneau β relié par une boucle à une hélice α . Ces domaines LRR forment des

structures en fer à cheval dont la partie concave est à l'origine de la reconnaissance et de la liaison avec les différents ligands des pathogènes. Bien que tous les TLRs présentent des domaines LRR conservés, ces récepteurs interagissent avec une quantité de ligands impressionnante et spécifique à chacun d'entre eux (Akira, Takeda et al. 2001; Medzhitov 2001; Janeway et Medzhitov 2002). Par ailleurs, la localisation des TLRs explique aussi leur aptitude à interagir avec différents ligands. Ainsi, TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6 sont localisés à la surface cellulaire et recrutés, après activation par leurs ligands respectifs, par les phagosomes. À l'inverse, TLR3, TLR7 et TLR9 (impliqués dans la reconnaissance des séquences nucléotidiques) sont situés à l'intérieur des cellules (Ahmad-Nejad, Hacker et al. 2002; Heil, Ahmad-Nejad et al. 2003; Matsumoto, Funami et al. 2003).

3.4. Spécificité de ligands des TLRs

3.4.1. TLR4

Comme il a été mentionné ci-dessus, TLR4 est impliqué dans l'induction de la réponse inflammatoire induite par le LPS des bactéries à Gram négatif. De tous les TLRs, TLR4 est le premier identifié et le mieux caractérisé. Ainsi, le LPS interagit avec la LBP qui achemine cette molécule jusqu'au CD14. Le CD14 s'associe physiquement avec le TLR4 ainsi qu'avec la protéine membranaire MD-2 (Beutler et Rietschel 2003). Bien que dépourvue de domaine transmembranaire, MD-2 reste associé à la membrane des cellules en interagissant avec le domaine extracellulaire de TLR4 (Akashi, Shimazu et al. 2000). Ainsi, une transfection simple de TLR4 ne permet pas de restaurer une réponse au LPS et requiert la cotransfection de MD-2 (Shimazu, Akashi et al. 1999). Par ailleurs, il a été aussi montré qu'une mutation pour MD-2 chez des cellules CHO abroge la réponse au LPS alors qu'un retour du phénotype sauvage restaure cette réponse (Schroamm, Lien et al. 2001). Par conséquent, la détection de TLR4 nécessite au moins la présence de trois protéines : TLR4, CD14 et MD-2. CD14, quant à lui, semble concentrer le LPS à proximité du complexe TLR4-MD-2 (Jiang, Akashi et al. 2000). L'importance de ces trois

protéines dans la reconnaissance est mise en lumière par l'observation qu'une mutation dans l'un des trois gènes impliqués dans la synthèse de TLR4, CD14 ou MD-2 suffit à abroger la réponse au LPS (Haziot, Ferrero et al. 1995; Hoshino, Takeuchi et al. 1999; Nagai, Akashi et al. 2002). De plus, l'analyse chez l'homme du polymorphisme de ces gènes est corrélée avec des variations relatives dans la capacité à induire une réponse immunitaire robuste chez les individus testés (Hamann, Kumpf et al. 2004).

Chez la souris, il a été montré qu'une déficience pour l'une de ces composantes est à l'origine d'une susceptibilité accrue lors d'une infection à *Salmonella enterica* de sérovar Typhimurium, montrant ainsi que le principe de la réponse immunitaire innée est tout aussi important dans la protection contre les infections bactériennes que la réponse de l'immunité acquise (Miller, Ernst et al. 2005).

Contrairement à ce qui est observé chez la souris, les mécanismes de reconnaissance par TLR4 chez l'homme sont plus complexes et vont jusqu'à discriminer différentes structures du lipide A (Miller, Ernst et al. 2005). Des études comparatives entre espèces montrent ainsi que le domaine extracellulaire de TLR4 est moins conservé que le domaine cytoplasmique (Miller, Ernst et al. 2005). De plus, le domaine extracellulaire présente des régions hypervariables, reflétant une pression de sélection nécessaire à la reconnaissance de diverses structures du lipide A (Miller, Ernst et al. 2005). Par ailleurs, d'autres études suggèrent que TLR4 et MD-2 participent directement dans la discrimination des différentes structures du LPS. Ainsi, les cellules de souris et de hamster répondent à une structure partielle du lipide A (le lipide IVa) alors que les cellules humaines ne le peuvent pas (Vogel, Madonna et al. 1984; Golenbock, Hampton et al. 1991). En accord avec ces observations, d'autres études ont montré que le LPS se trouve à proximité du complexe TLR4-MD-2 uniquement en présence du CD14. Ceci suggère qu'indépendamment de la structure du LPS, le CD14 achemine le LPS au complexe TLR4-MD-2 qui alors induit un signal chez l'homme variant selon la structure du LPS (Miller, Ernst et al. 2005).

En plus du LPS, TLR4 est aussi impliqué dans la reconnaissance d'autres ligands appartenant au soi tout comme au non-soi. Ainsi, il a été montré que le taxol (substance naturelle extraite de l'if et utilisée dans la lutte de certains types de cancer) induit chez la souris une réponse similaire à celle observée avec le LPS et que, tout comme avec le LPS, les souris C3H/HeJ sont incapables d'induire une réponse inflammatoire après être stimulées par ce composé (Kawasaki, Akashi et al. 2000; Byrd-Leifer, Block et al. 2001).

TLR4 est aussi impliqué dans la reconnaissance de la protéine de fusion F du virus syncytial respiratoire (Rassa, Meyers et al. 2002). Alors que chez des cellules sauvages, cette protéine induit une réponse forte, son activité biologique est abolie chez des cellules de souris déficientes pour CD14 ou TLR4. Les protéines de choc thermique endogènes et exogènes font partie aussi des molécules susceptibles d'être reconnues par TLR4 (Ohashi, Burkart et al. 2000; Vabulas, Ahmad-Nejad et al. 2002). En effet, il a été montré que des cellules issues de souris génétiquement déficientes pour TLR4 présentent une faible susceptibilité aux infections.

TLR4 serait aussi impliqué dans la reconnaissance d'autres molécules comme le fibrinogène (Okamura, Watari et al. 2001) et la pneumolysine (Malley, Henneke et al. 2003) mais le rôle exact de ce récepteur reste encore à être éclairci.

3.4.2. TLR2

À la différence de TLR4, TLR2 reconnaît les composantes bactériennes sous forme d'hétérodimère (Ozinsky, Underhill et al. 2000) en combinaison soit avec TLR1 (Wyllie, Kiss-Toth et al. 2000), soit avec TLR6 (Takeuchi, Kawai et al. 2001). Ceci a, entre autres, comme répercussions un élargissement des ligands potentiels de ce récepteur.

Les données accumulées depuis la découverte de TLR2 montrent que ce récepteur joue un rôle très étendu dans la reconnaissance de divers pathogènes. Il peut ainsi

reconnaître les lipoprotéines des mycobactéries (Takeuchi, Sato et al. 2002), des spirochètes (Lien, Sellati et al. 1999), tout comme le glycosylphosphatidylinositol servant à l'ancrage des protéines à la surface du parasite *Trypanosoma cruzi* (Campos, Almeida et al. 2001) ou encore le zymosan des champignons (Ozinsky, Underhill et al. 2000). De plus, TLR2 peut reconnaître le PGN et le LTA des bactéries à Gram positif (Dziarski 2003; Moreillon et Majcherczyk 2003; Wetzler 2003). Dans le cas de la reconnaissance de *S. aureus*, il a été ainsi montré qu'une déficience de ce récepteur provoque une plus grande susceptibilité à une infection expérimentale dans un modèle murin (Takeuchi, Hoshino et al. 2000; Hoebe, Georgel et al. 2005). Cependant, la reconnaissance du LTA et du PGN par TLR2 reste toujours un sujet à controverse. Le LTA est une composante majeure des bactéries à Gram positif capable d'induire la libération de cytokines (Ginsburg 2002). Il est de ce fait un ligand potentiel pour TLR2. En revanche, la majorité des études a été réalisée à partir de préparations commerciales de LTA (Gao, Xue et al. 2001). Il s'est avéré par la suite que ces préparations commerciales présentent non seulement une forte hétérogénéité dans la structure même du LTA, mais aussi des traces de contamination par d'autres endotoxines (Gao, Xue et al. 2001; Morath, Geyer et al. 2002). Tous ces éléments ont été à l'origine d'une controverse sur le rôle véritable du LTA dans l'induction de la réponse inflammatoire et, par extension, dans la reconnaissance par TLR2 (Fournier and Philpott 2005). Après la mise au point de nouvelles méthodes de purification éliminant toute trace de contamination, il s'est avéré que le LTA de *S. aureus* possède la même capacité à induire la libération de cytokines que les préparations commerciales (Gao, Xue et al. 2001; Lehner, Morath et al. 2001; Morath, Geyer et al. 2001; Morath, Stadelmaier et al. 2002). De plus, en utilisant des souris génétiquement déficientes pour TLR2 ou à l'aide d'anticorps neutralisant, il a été montré que TLR2 est nécessaire à la reconnaissance du LTA (Takeuchi, Hoshino et al. 1999; Michelsen, Aicher et al. 2001; Han, Kim et al. 2003; Esen, Tanga et al. 2004). Il est de plus à noter que les différences structurales du LTA entre différentes bactéries à Gram positif peuvent s'accompagner de différences dans la capacité à induire une réponse inflammatoire. En effet, si les LTAs de *S. aureus* et de *B. subtilis* induisent de

manière similaire la libération de cytokines après leur reconnaissance par TLR2 (Opitz, Schroder et al. 2001), celui de *S. pneumoniae* semble en revanche moins inducteur (Han, Kim et al. 2003; Travassos, Girardin et al. 2004).

Tout comme pour le LTA, le rôle de TLR2 dans la reconnaissance du PGN a été particulièrement étudié et demeure toujours sujet à controverses. Il est communément accepté que TLR2 est un récepteur de reconnaissance du PGN (McDonald, Inohara et al. 2005). En effet, il a été montré que le PGN de *S. aureus* se lie avec une forte affinité à une forme soluble de TLR2, suggérant ainsi que le domaine extracellulaire de TLR2 interagit directement avec le PGN et que cette interaction est à l'origine de la transduction de signal (Iwaki, Mitsuzawa et al. 2002). En revanche, une étude récente a montré qu'une préparation de PGN à haute pureté ne permet pas d'induire la production d'IL-6 et de TNF- α par un mécanisme TLR2-dépendant, contrairement au LTA (Travassos, Girardin et al. 2004). De ce fait, les auteurs ont suggéré que la stimulation observée de TLR2 par le PGN serait en fait attribuée à une contamination des préparations commerciales de PGN par d'autres composantes de la paroi bactérienne dont le LTA. Cette hypothèse a été encore une fois réévaluée et il semble que le PGN, tout comme le LTA, suffit pour déclencher un signal par TLR2 (Dziarski and Gupta 2005). TLR2 peut ainsi véritablement interagir avec une quantité impressionnante de ligands et les mécanismes expliquant cette forte diversité restent encore à éclaircir.

Comparé à TLR4, la reconnaissance par TLR2 est un processus complexe qui fait intervenir d'autres TLRs, et plus particulièrement TLR1 et TLR6. Ainsi TLR1 et TLR6 permettent de discriminer entre les lipoprotéines diacylées des triacylées (Weber, Moreillon et al. 2003; Wetzler 2003). TLR6 est nécessaire à la reconnaissance de MALP-2 (macrophage-activating lipopeptide 2 de *Mycoplasma pneumoniae*) (Takeuchi, Kawai et al. 2001) alors que TLR1 permet la reconnaissance des lipoprotéines des mycobactéries (Takeuchi, Sato et al. 2002; Sandor, Latz et al. 2003).

Ajouté à l'intervention de TLR1 et TLR6, d'autres molécules semblent impliquées dans la reconnaissance des composantes bactériennes par TLR2. Le CD14 interagit avec le PGN et le LTA de *S. aureus* (Weidemann, Brade et al. 1994; Cleveland,

Gorham et al. 1996; Gupta, Kirkland et al. 1996; Dziarski, Tapping et al. 1998; Han, Kim et al. 2003). Ainsi, le site de fixation pour le PGN a été identifié entre les acides aminés 135 et 146. En effet, une induction en présence de l'anticorps monoclonal Leu-M3, qui se lie à cette région, inhibe la fixation du PGN au CD14 (Dziarski, Tapping et al. 1998). Peu d'informations en revanche sont disponibles en ce qui concerne la fixation du LTA au CD14; seules des études de neutralisation contre le LPS et le LTA suggèrent que les sites de reconnaissance du LPS et du LTA sont proches avec une partie chevauchante (Gupta, Kirkland et al. 1996; Hermann, Spreitzer et al. 2002). Il a été aussi montré que la libération de cytokines induites par le LTA est inhibée par la présence du CD14 sous forme soluble, suggérant ainsi que le LTA déclenche l'activation des monocytes à l'aide du CD14 (Hermann, Spreitzer et al. 2002).

Récemment, CD36 a été aussi impliquée dans la reconnaissance de TLR2. CD36 est une glycoprotéine de membrane appartenant à la famille des scavengers récepteurs (Fournier and Philpott 2005). Il a été en effet montré que des souris génétiquement déficientes pour CD36 présentent une susceptibilité accrue après entrée dans l'organisme de *S. aureus* (Hoebe, Georgel et al. 2005). De plus, la production de cytokines est abolie chez ces mêmes souris après stimulation par le LTA et par MALP-2 sous forme configurationnelle R. En revanche, la reconnaissance par TLR2 de l'énantiomère S de MALP-2, d'un lipopeptide triacylée, ou du zymosan ne semble pas être affectée (Hoebe, Georgel et al. 2005). CD36 joue donc un rôle similaire à celui de CD14 en concentrant localement les ligands diacylés, favorisant ainsi la transduction de signal par TLR2 en combinaison avec TLR6.

3.4.3. TLR5

Contrairement à TLR4 et TLR2 qui possèdent plusieurs ligands différents, TLR5 se caractérise par une affinité exclusive pour la flagelline (Hayashi, Smith et al. 2001). Cette protéine, exprimée dans les flagelles bactériens, présente un pouvoir immunogène en activant le système immunitaire et les cellules épithéliales

de la muqueuse intestinale (Gewirtz, Navas et al. 2001). TLR5 induit un message transducteur similaire à celui de TLR2 et TLR4, menant à la production de cytokines pro-inflammatoires.

3.4.4. TLR9, TLR7 et TLR8

Les motifs CpG présents dans la séquence de l'ADN peuvent, tout comme les composantes des parois des bactéries à Gram négatif et positif, activer les macrophages ainsi que les cellules dendritiques en interagissant avec TLR9 (Wagner 2004). En effet, Hemmi *et al.* ont montré que des souris déficientes pour TLR9 sont réfractaires à la stimulation par ces motifs (Hemmi, Takeuchi et al. 2000) et Bauer *et al.* ont observé que TLR9 permet de répondre aux motifs CpG en activant une réponse pro-inflammatoire (Bauer, Kirschning et al. 2001). De plus, il semble que ce récepteur interagisse directement avec les séquences oligonucléotidiques. En effet, une fusion entre le domaine extracellulaire de TLR9 et la partie Fc d'IgG1 humain possède toujours la capacité de se lier à des séquences CpG à pH acide (Wagner 2004). Contrairement aux TLR1, 2, 4, et 6, TLR9 est localisé à l'intérieur des macrophages (Ahmad-Nejad, Hacker et al. 2002). L'entrée dans la cellule des séquences oligonucléotidiques ainsi que leur maturation (acidification) à l'intérieur de l'endosome sont de ce fait des processus apparaissant avant les mécanismes de signalisation cellulaire à l'origine de l'activité pro-inflammatoire (Hacker, Vabulas et al. 2000). Ainsi, TLR9 partage avec TLR3 des mécanismes d'activation communs car ils requièrent l'internalisation de leur ligand respectif à l'intérieur d'endosomes (Wagner 2004). Alors que les TLRs exposés à la surface cellulaire, comme TLR2 et TLR4, sentent rapidement la présence d'une infection bactérienne, les mécanismes impliquant TLR9, TLR7 et TLR8 sont de ce fait plus lents à apparaître à cause de la nécessité d'internaliser les bactéries intracellulaires et les virus (Wagner 2004). Cette particularité a aussi pour conséquence de faire un lien direct entre l'immunité innée et l'immunité adaptée. En effet, la présentation d'un pathogène au niveau de l'endosome suggère aussi la capacité de présenter les antigènes au complexe

d'histocompatibilité de type I (CMH I) (Guermonez, Saveanu et al. 2003; Latz, Schoenemeyer et al. 2004). Ainsi, l'endosome peut être considéré comme un site intracellulaire privilégié où les réponses immunitaires innée et acquise se rejoignent.

3.5. Cascade signalétique de la superfamille des TLRs et IL-1Rs

Après la fixation du ligand, les TLRs se dimérisent et subissent des modifications conformationnelles qui provoquent le recrutement d'autres molécules intervenant en aval de la cascade signalétique. Ces différentes molécules incluent l'adaptateur MyD88 (Myeloid differentiation primary-response protein 88), les protéines IRAKs (IL-1R associated kinases), TAK1 (Transforming Growth Factor β (TGF- β)-activated kinase), TAB1 (TKA1-binding protein), TAB2, TRAF6 (tumor-necrosis factor (TNF)-receptor associated factor 6) (Takeda, Kaisho et al. 2003) et NF- κ B.

3.5.1. MyD88

MyD88 a été en premier identifié comme un gène qui induit rapidement la différenciation des myélocytes en macrophages à la suite d'une stimulation par IL-6 (Lord, Hoffman-Liebermann et al. 1990). MyD88 présente dans sa partie N-terminale un domaine DD (death domain) et un domaine TIR en C-terminale. MyD88 joue le rôle d'adaptateur et recrute IRAK au complexe IL-1R après stimulation par l'IL-1 (Muzio, Ni et al. 1997; Wesche, Henzel et al. 1997; Burns, Martinon et al. 1998). L'association de MyD88 avec IRAK est réalisée grâce à l'interaction entre leur domaine DD respectifs (Dunne, Ejdeback et al. 2003). Ainsi, MyD88 joue le rôle d'adaptateur entre, d'une part, les TLRs et, d'autre part, les protéines possédant un domaine DD impliquées elles aussi dans la propagation du signal.

3.5.2. IRAKs

À ce jour, quatre protéines IRAK (IRAK1, IRAK2, IRAK4, IRAK-M) présentant différents motifs d'expression ont été identifiées chez les mammifères (Janssens and Beyaert 2003). Les IRAKs présentent un domaine DD ainsi qu'un domaine central kinase à sérine/thréonine. IRAK1 et IRAK4 possèdent une activité kinase intrinsèque, alors que IRAK2 et IRAK-M en sont dépourvues (voir section 3.7.). L'activité kinase d'IRAK1 augmente fortement à la suite de la stimulation par les TLRs. En revanche, l'activité kinase en soit n'est pas essentielle au signalement; en effet, chez des souris génétiquement déficientes pour IRAK1, une surexpression d'une protéine IRAK1 dépourvue d'activité kinase induit toujours l'activation de NF- κ B (Li, Commane et al. 1999).

À l'inverse, une surexpression d'IRAK4 n'induit pas une activation de NF- κ B de manière considérable; pourtant, l'expression d'un mutant inactif d'IRAK4 inhibe la production d'IL-1 via NF- κ B. Il a aussi été montré qu'IRAK1 est un substrat d'IRAK4 et non l'inverse (Li, Strelow et al. 2002). Chez des souris mutantes pour IRAK1, la production de cytokines en réponse à une stimulation par l'IL-1, ou par reconnaissance du LPS, s'avère diminuée mais pas complètement abolie (Kanakaraj, Schafer et al. 1998; Thomas, Allen et al. 1999; Swantek, Tsen et al. 2000), alors que des souris génétiquement déficientes pour IRAK4 sont dans l'incapacité de répondre à l'administration d'IL-1, de LPS ou de composantes bactériennes purifiées, montrant ainsi que la présence d'IRAK4 est primordiale dans les mécanismes de signalisation TLR-dépendants (Suzuki, Suzuki et al. 2002). Récemment, il a été montré que des patients souffrant d'une déficience en IRAK4 sont incapables de répondre à une stimulation par l'IL-1, l'IL-18 ou par les TLR2, 3, 4, 5 et 9 (Picard, Puel et al. 2003). Ainsi, IRAK4 et son activité kinase semblent être des pré-requis à la signalisation par les TLRs.

3.5.3. TRAF6

Les protéines de la famille TRAF constituent un groupe de protéines adaptatrices conservées (Bradley and Pober 2001). À ce jour, six membres de la famille des TRAFs ont été identifiés chez les mammifères. Elles se caractérisent toutes par la présence en N-terminal d'un domaine en double anneau (domaine TRAF-N) et d'un domaine C-terminal conservé (domaine TRAF-C). La partie N-terminale de la plupart des protéines TRAFs contient une région en doigt de zinc essentielle pour la propagation du signal, alors que le domaine TRAF-C s'auto-associe et interagit avec les protéines adaptatrices et les récepteurs situés en amont (Ye, Arron et al. 2002). Parmi les membres de cette famille, TRAF6 fonctionne comme transducteur de signal aussi bien pour la super-famille des récepteurs TNF (par interaction directe avec CD40 et TRANCER (TNF-related activation-induced cytokine receptor)) que pour celle des TLRs/IL-1Rs (via son association avec les protéines IRAKs).

3.5.4. TAK1 et les TABs

L'activation des facteurs transcriptionnels NF- κ B et AP1 (activator protein 1) par TRAF6 nécessite l'intervention de TAK1 et des adaptateurs TAB1 et TAB2. TAK1 appartient à la famille des MAPKKKs (mitogen-activated protein kinase kinase kinases) (Yamaguchi, Shirakabe et al. 1995) qui jouent un rôle essentiel dans l'activation de NF- κ B lors de l'induction par l'IL-1/LPS et le TNF (Takaesu, Surabhi et al. 2003). TAB1 fonctionne comme activateur de TAK1 en favorisant son activité kinase (Shibuya, Yamaguchi et al. 1996); TAB2, quant à elle, joue le rôle d'adaptateur en facilitant la liaison de TAK1 à TRAF6 et par extension, en facilitant l'activation de TAK1. Le rôle de TAB2 ne semble pas essentiel car des fibroblastes issus d'embryons de souris génétiquement déficientes pour TAB2 ne sont pas affectés dans leur capacité à activer NF- κ B à la suite d'une stimulation par IL-1/LPS ou TNF (Sanjo, Takeda et al. 2003). La compensation de l'activité de

TAB2 peut de plus s'expliquer par l'existence de TAB3 (récemment identifiée) qui favorise les interactions entre TAK1 et NF- κ B (Ishitani, Takaesu et al. 2003).

3.5.5. NF- κ B

La famille des facteurs transcriptionnels NF- κ B fonctionne sous la forme d'homo ou d'hétérodimère. NF- κ B sous la forme dimérique est maintenu dans le cytoplasme, dans un état inactif, par I κ B (inhibitor of NF- κ B). L'activation de NF- κ B implique la phosphorylation et la protéolyse d'I κ B, libérant ainsi NF- κ B du cytoplasme et lui permettant d'être transloqué au niveau du noyau. La phosphorylation d'I κ B, à l'origine de la libération de NF- κ B, est réalisée par le complexe IKK (I κ B kinase), lui-même constitué de sous-unités catalytiques IKK- α et IKK- β et de la sous-unité régulatrice IKK- γ (connue aussi sous le nom de NEMO, pour NF- κ B essential modulator) (Karin and Ben-Neriah 2000).

L'activation de NF- κ B nécessite cependant d'autres signaux. Ainsi, l'intervention d'autres protéines, en particulier p65, et d'autres kinases, notamment PKA (cyclic AMP-dependent protein kinase) et IKK, est impliquée dans ce mécanisme (Karin and Ben-Neriah 2000).

3.6. Cascades signalétiques MyD88-dépendantes et MyD88-indépendantes

Des souris génétiquement déficientes pour MyD88 sont incapables de produire le TNF ou l'IL-6 à la suite de la stimulation par l'IL-1 ou par des ligands reconnus par TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 ou TLR9 (Adachi, Kawai et al. 1998; Takeda, Kaisho et al. 2003). Ainsi, MyD88 est essentielle dans la réponse à différentes composantes d'origine exogène. Cependant, d'autres études réalisées sur des cellules déficientes en MyD88 ont montré que ces cellules sont toujours capables de répondre à une stimulation au LPS (Kawai, Adachi et al. 1999). Ainsi, la réponse au lipopeptide des mycoplasmes (engendrant un signal TLR2-dépendant) est abolie chez des macrophages génétiquement déficients pour MyD88 alors que les activations de NF- κ B et de MAPK en réponse au LPS sont retardées mais

toujours observables chez ces mêmes macrophages (Kawai, Takeuchi et al. 2001). Cette réponse concerne d'autres médiateurs de la réponse immunitaire en touchant des gènes induits par l'interféron. De plus, l'expression de ces gènes est abolie chez des macrophages déficients pour TLR4, montrant de ce fait qu'ils sont produits sous la dépendance de TLR4 par des mécanismes indépendants de la présence de MyD88. TLR2 ne semble en revanche pas empreinter un mécanisme MyD88 indépendant dans la mesure où l'activation de ce récepteur n'induit pas l'expression des gènes induits par l'IFN. Ainsi, l'expression des gènes à l'origine, et d'une activité pro-inflammatoire, et de la libération de molécules co-stimulatrices correspond à un phénomène dépendant des TLRs et pourtant régulé de façon différentielle.

3.7. Régulation négative de la signalisation TLR-dépendante

Puisque les cytokines pro-inflammatoires, lorsqu'elles sont produites en excès, sont à l'origine de désordres graves pouvant entraîner une forte mortalité, il n'est pas surprenant d'observer des mécanismes de modulation des réponses TLRs-dépendantes. Parmi les molécules à l'origine d'une inhibition de la signalisation via les TLRs, IRAK-M est une protéine exprimée uniquement chez les monocytes et les macrophages et dont la synthèse est activée à la suite de la stimulation par un des ligands des TLRs. De plus IRAK-M ne présente pas d'activité kinase (Janssens and Beyaert 2003) mais maintient IRAK1 et IRAK4 associées à MyD88, empêchant ainsi la formation du complexe IRAK1-TRAF6. Ainsi, des souris déficientes pour IRAK-M synthétisent les cytokines pro-inflammatoires en quantité supérieure à ce qui est observé pour des souris wild-type et sont incapables de développer des mécanismes de tolérance immune après induction par le LPS (Kobayashi, Hernandez et al. 2002).

SOCS1, appartenant à la famille des protéines SOCS, est un autre régulateur négatif de cette cascade signalétique (Yasukawa, Sasaki et al. 2000). Chez des macrophages, sa synthèse est induite après libération de cytokines à la suite de la stimulation par le LPS et les motifs CpG (Stoiber, Kovarik et al. 1999; Dalpke,

Opper et al. 2001) et l'utilisation de souris déficientes pour cette protéine montre que ces souris sont plus susceptibles au choc endotoxique provoqué par une stimulation par le LPS (Kinjyo, Hanada et al. 2002; Nakagawa, Naka et al. 2002). Ces souris, comme les souris déficientes pour IRAK-M, ne développent pas non plus une tolérance au LPS et une transfection avec SOCS1 chez des macrophages suffit à inhiber l'activation de NF- κ B, induite par le LPS, montrant ainsi que SOCS1 réprime directement la cascade signalétique passant par les TLRs. Bien que SOCS1 s'associe avec IRAK1 (Nakagawa, Naka et al. 2002), les mécanismes précis employés par SOCS1 pour inhiber la signalisation par les TLRs demeurent encore non détaillés.

MyD88s est un variant de MyD88 dépourvu de son domaine intermédiaire et dont la production est activée chez des monocytes après une stimulation par le LPS. À l'instar de MyD88, MyD88s est incapable de se lier à IRAK4 et sa surexpression n'induit pas la phosphorylation d'IRAK1 (Burns, Janssens et al. 2003). Ainsi, MyD88s inhibe l'activation de NF- κ B à cause de son incapacité à entrer en interaction avec IRAK4 et de favoriser la phosphorylation d'IRAK1.

D'autres molécules inhibant la cascade signalétique TLR-dépendante sont trouvées à la surface membranaire. Ainsi SIGIRR et ST2 possèdent des domaines TIR et sont impliquées dans la régulation négative des TLRs. En effet, des études ont montré que des souris génétiquement déficientes pour SIGIRR sont plus sensibles au choc septique provoqué par le LPS (Wald, Qin et al. 2003) et que SIGIRR, à la suite de la stimulation des TLRs, peut interagir de façon transitoire avec TLR4, IRAK1 et TRAF6. D'une manière similaire, il a été démontré que des souris déficientes pour ST2 présentent une production accrue en cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'un défaut dans la tolérance immune au LPS (Brint, Xu et al. 2004).

4. OBJECTIFS DU PROJET DE MAÎTRISE

Les premiers objectifs du projet de maîtrise sont d'étudier le rôle de *S. suis* dans l'induction de la transcription de TLR2 et du CD14 chez deux lignées de

macrophages murins et humains ainsi que de doser les cytokines et chimiokines libérées dans le surnageant de culture associées à la stimulation de ces macrophages par *S. suis*.

Cette étape a permis ensuite d'identifier le récepteur Toll-Like impliqué dans l'activation de ces macrophages, soit en inhibant à l'aide d'anticorps spécifiques à TLR2 et TLR4 (dans le cas des macrophages humains), soit par comparaison entre lignées sauvages et lignées génétiquement déficientes pour TLR2 ou MyD88 (dans le cas des macrophages murins).

Enfin, le dernier objectif de ce projet de maîtrise a été d'identifier une composante bactérienne responsable de l'induction d'une réponse immune en utilisant un mutant non-capsulé ainsi que des préparations de la capsule et de la paroi bactérienne comme stimuli.

III- MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article

***Streptococcus suis* serotype 2 recognition by TLR2 confers
responsiveness by human and murine macrophages.**

Soumis à *Infection and Immunity*

RESEARCH ARTICLE

***Streptococcus suis* serotype 2 recognition by TLR2 confers
responsiveness by human and murine macrophages.**

RICHARD GRAVELINE, MARIELA SEGURA, MARCELO GOTTSCHALK*

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Faculté de
médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

Running title: *S. suis* recognition by TLR2

*Corresponding author. Mailing address: GREMIP, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6,
Canada. Phone: 450-773-8521, ext. 8374. Fax: 450-778-8108. E-mail:
gottschm@medvet.umontreal.ca

ABSTRACT

Streptococcus suis is a swine pathogen which occasionally causes disease in humans. As in pigs, meningitis in humans is considered to be the most severe form of disease. However, septicemia and toxic shock are also frequently reported. Although the involvement of CD14 in the recognition of *S. suis* by host cells has been reported, the mechanisms underlying the exacerbated release of several pro-inflammatory cytokines, thought to have a negative impact on the disease outcome, are poorly elucidated. Since, recognition of pathogens by the family of Toll-Like receptors (TLRs) has been shown to mediate activation of the inflammatory response; the purpose of this study was to evaluate the relative contribution of TLR2 and TLR4 in the activation of phagocytes by *S. suis*. Stimulation of human monocytes by whole *S. suis* or its purified cell wall components influenced the relative expression levels of TLR2 and CD14 mRNA. Moreover, this stimulation triggered the release of cytokines and chemokines, which was significantly blocked by monoclonal antibodies against TLR2 but not by antibodies against TLR4. Similar results were obtained when cells deficient in TLR2 were stimulated by *S. suis*. In addition, by using MyD88 knock-out macrophages, we demonstrated that this adaptor protein is the major downstream mediator of *S. suis* induced cytokine production. Taken together, these data elucidate the role of TLR2, by a MyD88-dependent mechanism, in the recognition of *S. suis* by host cells. Moreover, by comparing cytokine profiles induced by an encapsulated strain to its unencapsulated mutant, or by purified capsule and *S. suis* cell wall, it was demonstrated that the cell wall is mainly responsible for this activation and that the capsule activates the release of MCP-1 in a TLR-independent manner. Thus, this study contributes to a better understanding of the inflammatory features induced by this pathogen.

Keywords : *Streptococcus suis*, zoonose, meningitis, inflammation, TLR, capsule, cell wall.

INTRODUCTION

Streptococcus suis is a Gram positive, encapsulated coccus considered to be an agent of infections in swine as well as in humans who work in close contact with pigs, world wide (15). To date, 33 capsular types (19) have been identified with *S. suis* capsular type 2 regarded as the most frequently associated with disease. The clinical presentation of *S. suis* may vary from asymptomatic bacteremia to fulminant systemic disorder. Meningitis is the most striking feature and the presence of fibrin, oedema and cellular infiltrates in the meninges and choroids plexus are the histopathological characteristics most frequently observed. Recently, an unprecedented outbreak in China has been reported which resulted in more than 200 human cases associated with an outbreak in pigs. Of these human cases almost 40 have been fatal. Knowledge of virulence factors is still limited. Several molecules have been proposed but only the capsular polysaccharides (CPS) has been proven so far to be *per se* critical in the pathogenesis of *S. suis* infections (9, 39, 43). Among the other putative factors, a hemolysin (also known as suilysin and belonging to the same family than streptolysin O, listeriolysin, perfringolysin, and pneumolysin) and two proteins (a muramidase-released proteins, MRP, and an extracellular factor, EF) have been reported in *S. suis* capsular type 2 (for review, see reference (38)). However, most virulent North American strains do not possess these factors and isogenic mutants lacking either of these proteins appear to be as virulent as wild type strains. These observations suggest a multifactorial process in which particular functions can be fulfilled by alternative factors. Although the pathogenesis of meningitis caused by *S. suis* serotype 2 remains poorly elucidated, some mechanisms have been proposed. *S. suis* is often transmitted via the respiratory route and remains localized in the palatine tonsils. From this site, bacteria may gain access to the bloodstream, where they persist until they reach the central nervous system (CNS). Although there is some controversy on the mechanisms used by *S. suis* to disseminate in blood, it is believed that *S. suis* avoids clearance by professional phagocytes by means of its anti-phagocytic CPS (5, 10, 43). Mechanisms used by *S. suis* to cross the blood-brain barrier (BBB) are

poorly known. Recently, it has been shown that *S. suis* is able to interact, invade and survive (to a certain extent) inside endothelial cells of porcine brain origin (52). However, other mechanisms, such as up-regulation of pro-inflammatory mediators and increased leukocyte trafficking, may contribute to the breakdown of the BBB (37, 44). All these processes could, therefore, have a direct impact on the development of meningitis. Indeed, other studies from our laboratory have shown that *S. suis* is able to induce the release of cytokines and chemokines by human brain endothelial cells (51) and by mouse and human phagocytes (40, 41), and to up-regulate the expression of adhesion molecules on human monocytes (4). Therefore, the capacity of *S. suis* to induce a strong inflammatory response in the CNS may be the leading cause of increased intracranial pressure, which is responsible for the clinical signs of meningitis. Our understanding of the pathogenesis of disease caused by *S. suis* has been further increased by the observation of CD14-dependent and independent cytokine and chemokine production by human monocytes (41). CD14 is a pattern recognition receptor which exists either as a soluble molecule found in the serum (sCD14) or as a membrane glycoprotein (mCD14) where the C-terminal leader sequence of 28-30 amino acids is replaced by a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchor after translation. It is present on the surface of mature myeloid cells and differentiation of monocytes into macrophages is accompanied by an increase in mCD14 receptor expression levels. CD14 has been shown to be important in the recognition of lipopolysaccharide (LPS, the major component of the outer membrane of Gram negative bacteria) (56) but also of other cell wall constituents of Gram positive bacteria (33). Because of its lack of a cytoplasmic domain, CD14 needs to interact with another component on the cell surface to allow the activation of intracellular signalling pathways. The discovery of the Toll-Like Receptors (TLRs) has greatly elucidated the steps involved during the innate host defence mechanisms against invading microorganisms. The TLRs are members of the interleukin 1 receptor (IL-1R) family and are a critical determinant of the innate immune and inflammatory responses against invading pathogens (for reviews, see references (1, 2, 21, 29, 32, 46)). They include leucine-rich repeats in the ectodomain and a Toll/IL-1R

cytoplasmic domain. They share a common signalling pathway which triggers the association of MyD88 with several kinases leading to the translocation of NF- κ B to the nucleus to induce the expression of its target genes (3). So far, 11 TLRs have been identified in humans. The first identified was TLR4 which is the signal transducer for the LPS of Gram negative bacteria (6). Since then, TLRs have been shown to recognize and mediate signals for a wide range of microbial components: TLR1 (in association with TLR2, TLR1/2) for triacyl lipopeptides; TLR2 for the recognition of Gram positive bacteria (54); TLR3 for double-stranded RNA; TLR5 for flagellin; TLR6 (in association with TLR2, TLR2/6) for diacyl lipopeptides; TLR7 for single-stranded RNA, and TLR9 for nonmethylated CpG DNA. In swine, few studies have been reported concerning the implication of TLRs in *S. suis* infection. One report identified the presence of TLR2 and TLR6 in swine as being involved in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection (34), a second identified the presence of TLR2 on the intestinal M cells in swine (48) and a third detected the presence of TLR9 in Peyer's patches as in mesenteric lymph nodes (42). The recognition of these pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by the various members of the TLR family leads to the synthesis and release of antimicrobial peptides, inflammatory cytokines and chemokines, and other costimulatory molecules that provide a link to adaptive immunity. Two of the TLR members (TLR2 and TLR4) have been reported to be associated with CD14 and to mediate recognition of cell wall components from Gram negative and Gram positive bacteria. Thus, the purpose of this work is to evaluate the interaction of *S. suis* serotype 2 and its surface components with TLR2, TLR4, and CD14 on phagocytic cells and the consequent cell activation through these receptors and their common down-stream adaptor molecule, MyD88.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Cell culture media, foetal bovine serum (FBS), penicillin G (PenG) and streptomycin (Sm) were purchased from Gibco (Burlington, WT); 2 β -mercaptoethanol (2-ME) was obtained from Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). Ultra-purified *Escherichi coli* O55:B5 LPS and MALP-2 and recombinant human IFN- γ were purchased from CEDARLANE Laboratories (Hornby, Ontario, Canada). Polymixin B sulphate (PmB) was obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

Bacterial strains and growth conditions

The *S. suis* type 2 virulent strain 31533, originally isolated from a case of porcine meningitis (27) and previously used for studies of cytokine production by both mouse (40) and human cells (41, 51) was used as the reference strain in comparison with its isogenic uncapsulated mutant B218. Mutant B218 was produced in our laboratory by allelic exchange and corresponds to a previously reported transposon-derived mutant (9). It was confirmed to be nonencapsulated by electron microscopy and has been genetically characterized (Fittipaldi *et al.*, *manuscript in preparation*). Bacteria were maintained as stock cultures in 50 % glycerol-Todd-Hewitt broth (THB; Difco Laboratories, Detroit, MI) at -80°C. Bacteria were grown overnight onto bovine blood agar plates at 37°C, and isolated colonies were used as inocula for THB, which were incubated for 18 h at 37°C. Working culture for cell stimulation assays were produced by inoculating 10 ml of the overnight culture into 200 ml THB with agitation at 37°C for 6 h until they reached the mid-log phase (540 nm, optical density of 0.4-0.5). Bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, and diluted to approximately 2 x 10⁹ colony-forming-units (CFU)/ml in PBS. The final suspension was plated onto THB agar in order to accurately determine CFU/ml. Bacteria were then killed by heat-treatment by incubating organisms at 60°C for 45 min (minimal experimental conditions required for killing *S. suis*, (40)). The killed cultures were subcultured onto blood

agar plates at 37°C for 48 h to confirm the absence of viable organisms. Killed bacteria preparations were stored at 4°C and resuspended in cell culture media just before stimulation assays.

Purified bacterial components

Purified CPS of *S. suis* serotype 2 was prepared as previously reported (11). Purified cell wall was produced using a modified protocol adapted from Tuomanen et al. (50) and Heumann et al. (18), as previously reported (40).

Cell lines and cell culture

THP-1 human monocytic cell line, derived from an acute monocytic leukemia (ATCC TIB-202, Rockville, MD), was maintained in RPMI 1640 medium. Cell culture medium was supplemented with 10 % heat-inactivated FBS, PenG (2.5 U/ml)-Sm (2.5 µg/ml) and 2-ME (5.5×10^{-5} M) and cells were incubated at 37°C with 5 % CO₂. Bone-marrow derived TLR2^{-/-} and MyD88^{-/-} mouse macrophages were kindly provided by Dr. Radzioch, McGill University, Canada (8). TLR2^{-/-}, MyD88^{-/-} and wild type cells were grown at 37°C with 5 % CO₂ in Dubelcco Modified eagle medium supplemented with PenG-Sm and 10 % FBS respectively.

Stimulation assays

For simulation assays with human THP-1 monocytes, cells were pre-activated and differentiated by pre-treatment with IFN-γ (500 U/ml) for 48 h before the assay as previously described (41). Differentiated THP-1 monocytes were then washed and resuspended in fresh medium at 10⁶ cells/ml, and 0.5 ml of this suspension was distributed in 24-well-plates (Falcon™, Becton Dickinson, Bedford, MA). For stimulation assays with TLR2^{-/-}, MyD88^{-/-} and wild type mouse macrophages, cell cultures were resuspended in fresh media at 10⁶ cells/ml and 0.5 ml of this suspension distributed in 24-well-plates. *S. suis* strain 31533 or the mutant strain B218 (0.5 ml), diluted to 10⁹ CFU/ml in culture medium, were then added to the culture plates in duplicate wells. In selected experiments, cells were stimulated with purified *S. suis* cell wall (150 µg/ml) or purified CPS (100 µg/ml). These

concentrations were chosen based in our previous results (40, 51). Cells stimulated with LPS (50 ng/ml) and MALP-2 (10 ng/ml) served as positive controls. Cells cultured in medium alone served as controls for spontaneous cytokine release and basal level of mRNA expression. Cell culture plates were incubated at 37°C with 5 % CO₂. At different time intervals (see Results), culture supernatant were harvested from individual wells, aliquoted, and frozen at -20°C until analysis. The cell pellet was then treated with 1 ml of Trizol reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) to extract RNA as described by the manufacturer. The final RNA pellet was resuspended in 20 µl of DEPC-treated water, and RNA concentration was measured using the Ribogreen RNA quantitation kit (Invitrogen). RNA was stored at -80°C for future use.

Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) assay for TLR2, TLR4, CD14

Reverse transcription of the mRNA samples to cDNA was performed with Superscript II (Invitrogen) and random primers (Roche, IN, USA). Total mRNA (2 µg), was mixed with 200 ng of random primers, 10 mM deoxynucleoside triphosphates mixture (dNTP, Pharmacia, Biosciences, NJ, USA) and DEPC-treated water up to 20 µl, then heated at 65°C for 5 min and cooled at 4°C in a T-Gradient thermocycler Whatman (Biometra GmbH, Goettingen, Germany). 5X first-strand Buffer (Gibco), 0.1 M DTT, and RNase Guard ribonuclease inhibitor (Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, QC, Canada) were then added and the reaction sample was incubated 10 min at 25°C, then 2 min at 42°C. Superscript II reverse transcriptase 400 U/l (Invitrogen) was finally added and the resulting mixture was incubated 50 min at 42°C, 15 min at 70°C and held at 4°C. Samples were conserved at -20°C until used. The primers used for PCR were obtained from Invitrogen and presented the following sequences: TLR2, forward 5'-ATGAAAATGATGTGGGCCTG-3' and reverse 5'-TTACCCAAAATCCTTCCCGC-3'; TLR4, forward 5'-CTGCAATGGATCAAGGACCA-3' and reverse 5'-TCCCACTCCAGGTAAGTGTT-3'; CD14, forward 5'-AGGACTTGCACCTTCCAGCTTG-3' and reverse 5'-

TCCCGTCCAGTGTCAGGTTATC-3'. Human β -actin served as housekeeping gene and was amplified using the following primers: 5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3' and reverse 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'. The PCR mixture contained 2 μ l of the cDNA, 2.5 μ l of 10X PCR buffer (Roche), 10 mM dNTP (DNA polymerization mixture, Amersham Biosciences), 1 μ l of Taq DNA polymerase (Roche), and 0.4 μ l of each gene primers in a total volume of 25 μ l. Amplification was performed in a Tgradient Thermocycler Whatman (Biometra) as follows: TLR2 and CD14, 32 cycles of denaturation at 95°C for 40 s, annealing at 55°C for 40 s, and elongation at 72°C for 1 min; TLR4, 29 cycles of denaturation at 95°C for 40 s, annealing at 55°C for 40 s, and extension at 72°C for 1 min. Amplified samples were visualized on 1.8 % agarose gels stained with ethidium bromide and photographed under UV. The intensity of bands was quantified by densitometry with an AlphaImager 2000 Multimage camera (Alpha Innotech Corp., CA) and software (AlphaEase 3.2). To compare the relative mRNA expression levels from each of the samples, the values are presented as the ratio of the band intensities of the cytokine RT-PCR product over the housekeeping RT-PCR product run simultaneously. Absence of competition between specific gene and housekeeping primers was confirmed before selection of the primers.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for cytokines

The concentration of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and MCP-1 released into the media by human and mouse macrophages were measured by ELISA using pair-matched monoclonal antibodies (MAbs) from R&D Systems, according to the manufacturer's recommendations. All cytokine standards were obtained from R&D Systems. Supernatant dilutions were added in duplicate wells to each ELISA plate. Analyses were performed at least four times for each individual monocyte-stimulation assay.

TLR2 and TLR4 blockade

In selected experiments, neutralizing anti-human TLR2 or anti-human TLR4 Mabs were used to assess whether cytokine production induced by *S. suis* or its purified components follows a TLR2 or a TLR4 pathway. IFN- γ pre-activated THP-1 cells were cultured in the presence of mouse anti-human TLR2 (TL2.1; 15 μ g/ml), TLR4 (HTA125; 15 μ g/ml), or immunoglobulin (Ig) isotype-matched (IgG2a) control MAbs. MAbs were obtained from e-Bioscience (San Diego, CA) and were added, as indicated by the manufacturer, to ensure complete neutralization. Additional neutralizing MAbs were added to the cell cultures 1 h prior to the bacterial stimuli. After 8 h of stimulation, culture supernatant were harvested and analyzed for cytokine production as described above.

Statistical analysis

Each cell stimulation test was done at least in triplicate. Cytokine semi-quantitative values for RT-PCR are expressed as the mean cytokine/housekeeping ratios from three independent experiments, whereas quantitative values obtained by ELISA are expressed as means \pm SD of pg/ml values. Differences were analyzed for significance by using the Student's unpaired *t*-test (two-tailed *P*-value). A *P*-value < 0.05 was used as threshold for significance.

RESULTS

***S. suis* modulates the expression levels of TLR2 and CD14, but not TLR4 mRNA.** It has been reported that THP-1 monocyte cells express TLR2 and TLR4 as measured by RT-PCR (58). However, the regulation occurring at the transcriptional level for these two receptors following stimulation with *S. suis* is not known. To analyze whether *S. suis* modulates the mRNA expression levels of these pattern recognition receptors, THP-1 human monocytes were stimulated with bacteria of encapsulated *S. suis* serotype 2 strain 31533 or its isogenic unencapsulated mutant B218. MALP-2 (a lipopeptide originally isolated from *Mycoplasma fermentans*) and LPS were used as positive controls for the induction of mRNA expression of TLR2 (22) and CD14/TLR4 (36) respectively. At different time intervals, total RNA was extracted to determine the relative mRNA levels for TLR2, TLR4 and CD14 by RT-PCR, and compared with basal mRNA expression levels for these receptors in control cells incubated with medium alone. As shown in Fig. 1, THP-1 cells expressed a relatively constant basal level of TLR2, TLR4 and CD14 mRNA throughout the incubation period. In contrast, 30 min after stimulation, both the encapsulated strain and its unencapsulated mutant up-regulated the expression of TLR2 mRNA to similar levels as those induced by the TLR2-ligand, MALP-2 (Fig. 1A). This up-regulation was followed by a decrease in mRNA expression, which was more pronounced with the unencapsulated mutant B218. A second peak of up-regulation was observed 18 h after stimulation of cells with the encapsulated strain 31533 as well as with MALP-2, but was delayed to 24 h after incubation of monocytes with mutant B218 (Fig. 1A). The kinetics of CD14 mRNA expression was different to those observed for TLR2 mRNA (Fig. 1B). Indeed, no differences in CD14 mRNA expression levels were observed during the first 8 h of incubation. Expression levels of CD14 mRNA started to increase at 18 h and continued to increase until at least 24 h after stimulation of monocytes with both *S. suis* strains, as well as with LPS, used as control (Fig. 1B). As reported by Tamai *et al.*, LPS also enhanced the expression of TLR4 in THP-1 cells in a time-dependent manner (47). This increase in TLR4 mRNA level was observed at 4 h of

incubation and continued to increase at least 24 h after LPS treatment (Fig. 1C). However, no changes in the expression levels of TLR4 mRNA were obtained after stimulation of cells with encapsulated and unencapsulated *S. suis* strains compared to cells incubated with medium alone. Taken together, these data suggest that THP-1 cells respond to the stimulation with *S. suis* by changes in the expression levels of TLR2 and CD14, which may indicate a possible interaction between *S. suis* and these pattern recognition receptors.

Purified components of *S. suis* also modulate the expression of TLR2 and CD14 mRNA. To further characterize the mechanisms by which *S. suis* is recognized by phagocytic cells, we analyzed the capacity of purified components from the cell surface of *S. suis* to modulate the expression of TLR2 and CD14. Indeed, several components exposed on the surface of Gram-positive bacteria are known to induce a proinflammatory activity through the recognition by TLR2 (33). Thus, human THP-1 monocytes were stimulated with whole bacteria or with purified polysaccharide capsule (CPS) or cell wall. Based on the results obtained in kinetic studies of TLR2 and CD14 expression (Fig. 1), mRNA levels were analyzed at 30 min, 8 h and 24 h for TLR2 and at 24 h for CD14 analysis. As observed in the previous experiment, changes in transcription levels of TLR2 mRNA occurred when cells were stimulated with whole bacteria (encapsulated and unencapsulated strains), an early up-regulation 30 min after stimulation being followed by a decrease at 8 h to reach a higher level of transcription at 24 h, (Fig. 2A). Similar trends were obtained when THP-1 cells were stimulated with purified CPS or the bacterial cell wall. However, these purified components were less potent inducers of TLR2 transcription at 30 min than whole bacteria. This may be due to a less efficient capacity of purified components to induce the expression of the TLR2 transcript within less than 30 min of incubation. However, both *S. suis*-derived CPS and cell wall stimulated similar levels of TLR2 mRNA expression as did whole bacteria, after a period of 24 h of incubation. Similar results were obtained at 24 h post-stimulation for CD14 mRNA expression (Fig. 2B). Indeed, both purified CPS and cell wall induced a late up-regulation of CD14 expression in a similar manner

than that observed with whole bacteria. Thus, purified components of the bacterial surface may be responsible, at least in part, for the modulation of TLR2 and CD14 mRNA expression observed with whole bacteria.

Differences in cytokine production between the encapsulated strain and its unencapsulated mutant. To verify the capacity of *S. suis* to induce an inflammatory response which may parallel the results on the modulation of TLR2 and CD14 expression, we analyzed the response in cytokine and chemokine production after cell stimulation with whole bacteria. Incubation of THP-1 monocytes with encapsulated *S. suis* resulted in a time-dependent production of cytokines. TNF- α production was highest at 8 h after stimulation whereas production of the four other cytokines tested gradually increased to at least 24 h after stimulation. Quantitatively, stimulated THP-1 cells secreted higher levels of IL-8 than of TNF- α , IL-1 β , IL-6 or MCP-1 (Fig. 3). Intermediate levels of IL-6 and MCP-1 (Fig. 3C and E) and lower levels of TNF- α and IL-1 β (Fig. 3A and B) were produced. Similar kinetics of cytokine production were observed with the encapsulated *S. suis* strain and its isogenic unencapsulated mutant. However, depending on the presence or absence of the CPS, three different patterns of cytokine production were observed: (1), B218 mutant induced significantly higher levels of TNF- α and IL-1 β than the encapsulated strain (Fig. 3A and B); (2), although levels of IL-6 and IL-8 induced by mutant B218 were slightly higher than those induced by the wild-type strain at 8 h of incubation, both the encapsulated strain and the unencapsulated mutant induced similar peak production levels of these cytokines following 18-24 h of cell stimulation (Fig. 3C and D); and finally, the encapsulated strain induced a higher level of MCP-1 production than the unencapsulated mutant (Fig 3E). Thus, both encapsulated and unencapsulated *S. suis* induced the release of the five cytokines tested and the quantitative differences observed are related to the presence or absence of the CPS.

Purified cell wall induces the release of cytokines and chemokines whereas purified CPS only stimulates MCP-1 production. Since different patterns of

cytokine production were observed after stimulation of human monocytes with encapsulated or unencapsulated *S. suis* strains, we were interested to analyze whether purified components of the cell surface, that is cell wall and CPS, were able to induce differential release of pro-inflammatory cytokines and chemokines. As shown in Fig. 4A to E, only purified cell wall of *S. suis* was able to induce the release of significant levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, and to a lesser extent TNF- α . Although, in general, the cell wall induced lower levels of cytokine production than those observed after cell activation with whole bacteria (Fig. 3), this purified component demonstrated a stimulating activity similar to or higher than that of the TLR2 ligand, MALP-2, or of the TLR4 ligand, LPS (Fig. 4). Previous reports also demonstrated that purified *S. suis* cell wall is able to induce the release of pro-inflammatory molecules by mouse macrophages and human brain endothelial cells (40, 51). In contrast, when THP-1 cells were stimulated with purified CPS, only significant MCP-1 production was detected, whereas levels of production of other cytokines were very low (Fig. 4). Thus, although both purified CPS and purified cell wall modulate the relative expression of TLR2 and CD14, only purified cell wall induced significant release of pro-inflammatory cytokines.

Neutralization of TLR2, but not TLR4, inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by THP-1 cells stimulated with *S. suis*. We have previously demonstrated that neutralization of the membrane form of the CD14 receptor on the surface of THP-1 cells by two different Mabs (clones MY4 and RMO52/IOM2) partially inhibited TNF- α , IL-1 β , IL-6, and MCP-1 release induced by *S. suis*, whereas the production of IL-8 was shown to be CD14-independent (41). To assess the role of TLR2 and/or TLR4 as part of the receptor complex used by *S. suis* to trigger cytokine production by human monocytes, THP-1 cells were pre-treated with MAbs against human TLR2 (clone TL2.1), human TLR4 (clone HTA125) or isotype controls before cell stimulation with either encapsulated *S. suis* strain 31533 or its unencapsulated mutant B218. LPS and MALP-2 were used as positive controls for TLR4 and TLR2 respectively. As already reported, these two MAbs selectively block the release of cytokine production by THP-1 cells,

depending on the stimuli used (14, 16, 45). As expected, pre-treatment of THP-1 cells with MAb anti-TLR4 significantly inhibited the production of all the five cytokines tested in response to LPS (Fig 5F to J). However, no significant effect was observed when cells pre-treated with MAb anti-TLR4, or with isotype-control MAb were stimulated with either the encapsulated or the unencapsulated *S. suis* strain or with MALP-2. On the other hand, pre-treatment of cells with anti-TLR2 MAb inhibited wild-type *S. suis*-induced TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and MCP-1 production by 80, 83, 87, 75 and 65% respectively and unencapsulated mutant-induced TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and MCP-1 production by 65, 71, 67, 50 and 21% respectively (Fig. 5A to E). The specificity of Mab TL2.1 was clearly demonstrated by the lack of inhibition of LPS-induced cytokine production, and the significant inhibition of MALP-2 stimulatory activity (Fig. 5A to E). These results also indicate that neutralization of TLR2 resulted in more efficient inhibition of TNF- α , IL-1 β and IL-6 than of IL-8 and MCP-1 release induced by both wild-type and unencapsulated *S. suis* strains. On the other hand, the inflammatory activity induced by the unencapsulated mutant was generally less affected by treatment of cells with Mab TL2.1 than that induced by the wild type strain, especially in the case of MCP-1 production induced by the mutant strain.

Since the purified cell wall demonstrated a higher pro-inflammatory activity than the purified CPS (Fig. 4), we also evaluated the effect of TLR2 neutralization on cytokine production induced by the former bacterial component. As shown in Fig. 5A to E, pre-treatment of cells with Mab TL2.1 significantly inhibited cell wall-induced TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and MCP-1 production by 87, 89, 87, 71 and 72% respectively. On the other hand, the production of MCP-1 induced by CPS, the only cytokine produced by activation of human monocytes with this bacterial component, was shown to be TLR2-independent (data not shown). It should be noted that neutralization of TLR4 by Mab HTA125 had no effect on the pro-inflammatory activity of either of these purified components (Fig. 5F to J, and data not shown). These data confirm that the mechanism(s) underlying *S. suis* stimulation of human monocytes involves mainly a TLR2- rather than a TLR4-pathway and suggest that activation of TLR-2-mediated cytokine induction may

involve interaction of this receptor with cell wall components on the bacterial surface.

MyD88 is the major down-stream mediator of TLR-dependent *S. suis*-induced cytokine production. To confirm the role of TLR2 in *S. suis*-induced cytokine production and to determine whether MyD88 is involved as adaptor molecule in the downstream signalling events induced by *S. suis* interaction with TLRs, we compared the capacity of bone marrow derived macrophages from wt and TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} mice to respond to *S. suis* stimulation. Wild type and TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} genetically deficient macrophages were incubated in the presence of either wild-type or unencapsulated *S. suis*, or with purified components of the bacterial surface, i.e. the CPS and the cell wall. LPS and MALP-2 were used as controls. Supernatants were harvested at 12 h and 24 h after stimulation, and release of MCP-1 and IL-6, respectively, as reporter cytokines was analyzed. These incubation times were shown to be optimal for the production of these cytokines (data not shown).

Wild-type *S. suis* induced production of both IL-6 and MCP-1 by wild type macrophages (Fig. 6A-B). This activity was significantly impaired in TLR2^{-/-} macrophages ($P < 0.01$). The non-encapsulated mutant induced similar levels of IL-6 and MCP-1 production by wild type macrophages as those observed with the parent strain ($P > 0.05$). However, whereas B218 mutant-induced IL-6 was significantly inhibited in TLR2^{-/-} macrophages ($P < 0.01$), MCP-1 production was unchanged (Fig. 6A-B). These results paralleled those observed after antibody-neutralization of TLR2 on human monocytes. It should be noted that cytokine release induced by MALP-2 was significantly impaired in TLR2^{-/-} macrophages ($P < 0.01$), whereas cytokine levels induced by LPS were similar to those observed in wild type cells ($P > 0.05$).

On the other hand, purified *S. suis* cell wall induced low but significant levels of IL-6 release and relatively high levels of MCP-1 production by wild type macrophages (Fig. 6A-B). Cell wall-induced IL-6 production was completely impaired in TLR2^{-/-} macrophages ($P < 0.001$), whereas MCP-1 release induced by

cell wall stimulation was reduced in TLR2^{-/-} macrophages by 41% compared to wild type cells ($P < 0.001$).

Since MyD88 is an adaptor protein that plays a critical role in signalling via all TLRs, MyD88^{-/-} macrophages were compared to wild type cells to determine the relative contribution of this protein in *S. suis*-mediated cell activation. As expected, the stimulatory activity of LPS and MALP-2 was almost completely abrogated in MyD88^{-/-} macrophages ($P < 0.01$). In addition, as shown in Fig. 6C-D, both IL-6 and MCP-1 production induced by wild type or unencapsulated *S. suis* as well as the stimulatory ability of the purified cell wall were all markedly inhibited in MyD88^{-/-} macrophages ($P < 0.01$).

It should be noted that MCP-1 production induced by purified CPS was not significantly affected in TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} macrophages compared to wild-type cells ($P > 0.05$; data not shown).

DISCUSSION

S. suis is a pathogen of increasing importance in the swine industry and our understanding of the mechanisms involved during infection needs to be elucidated. One of the most striking features during *S. suis* infection is the development of meningitis, for which the clinical signs are the consequence of an increased intracranial pressure, due to a strong inflammatory response in the CNS. Thus, understanding the way by which *S. suis* induces an inflammatory response, especially in the CNS, is necessary to develop new therapeutic or preventive strategies to combat this pathogen. Previous studies showed that *S. suis* induces the release of cytokines, chemokines, and other adhesion molecules in different cell lines. However, the mechanism by which *S. suis* is recognized remains unknown. Since TLRs have been identified as the receptors involved in the development of the innate immunity and the inflammatory response against invading pathogens, it was, therefore, of interest to study the interaction between TLRs and *S. suis*.

As previously reported by Segura *et al.*, *S. suis* induces the release of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and MCP-1 in a time-dependent manner (41). This increase in cytokine and chemokine production was correlated with a modulation of the transcription level of receptors and coreceptors which could be, at least in part, involved in its recognition. Thus, whereas the presence of *S. suis* did not seem to interfere with the level of TLR4 mRNA in THP-1 cells, this recognition was associated with a change in both TLR2 and CD14 expression. TLR2 mRNA expression was up-regulated as soon as thirty minutes after induction. Even if the mRNA expression pattern of TLR2 may not precisely reflect its protein level, an increased of TLR2 production at the protein level thirty minutes after treatment with bacterial lipoprotein on THP-1 cells has previously been observed (53). Moreover, the same authors also observed a decrease in the protein level of TLR2 as soon as two hours after stimulation. Our results suggest similar mechanisms since this up-regulation was followed by a decrease in the relative level of mRNA expression. If appropriate amounts of pro-inflammatory cytokines are required for antibacterial activity, an excess in inflammatory mediators is, on the contrary, at the

origin of the development of organ injury and septic shock. It is therefore not surprising to observe such phenomena of immune tolerance. Several proteins have been reported to diminish the cytokine response to infection (13, 26). Indeed, by comparing the response of wild-type and IRAK-M^{-/-} mice challenged with *Salmonella typhimurium*, it has been shown that IRAK-M^{-/-} mice exhibited an exacerbated response due to an enhanced TLR signalling (26) and as result were significantly impaired in the development of tolerance upon repeated stimulation. Moreover, Feterowski *et al.* recently observed that pre-treatment of mice with MALP-2 leads to both an attenuated systemic cytokine response after sepsis induction and the up-regulation of ST2 (another negative regulator of TLR signalling) mRNA *in vivo*, elucidating the role of ST2 in cytokine regulation (12). This negative feed-back was then followed with a second up-regulation of both TLR2 and CD14 mRNA expression which could correspond to a second phase of activation. In our study, since CD14 was not up-regulated at thirty minutes after induction, we hypothesized that these two genes were regulated independently. One hypothesis to explain the late up-regulation of CD14 mRNA is the requirement for THP-1 cell lines to be pre-activated with IFN- γ 24 h before induction. CD14 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein which is partially involved in the release of cytokines when THP-1 cells are stimulated with *S. suis*. Thus, although these results do not demonstrate a direct binding of *S. suis* with TLR2 and CD14, they strengthen the hypothesis of a recognition of *S. suis* by TLR2 in combination with CD14.

By using purified monoclonal antibody against TLR2 and TLR4, we did not observe any effect on cytokine release when THP-1 cells were incubated in the presence of monoclonal antibody anti-TLR4. However, a strong inhibition in TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and, to a lesser extent, MCP-1 production was obtained in the presence of MAAb anti-TLR2. This observation clearly demonstrated that TLR2 is responsible for the recognition of *S. suis* and, as consequence, for the release of all the cytokines and chemokines tested in this study. Nevertheless, Malley *et al.* reported that TLR4 can recognize pneumolysin from *S. pneumoniae* (30) and then induce the secretion of TNF- α and IL-6. As we used heat-killed *S. suis* in our

experiments, we must take into consideration that other compounds such as suliyisin (belonging like pneumolysin to the cholesterol-binding toxin family) could participate by a TLR4-dependent mechanism in the induction of a strong inflammatory response. Taken with previous report which showed a partial CD14-dependent induction of TNF- α , IL-1 β and IL-6, we concluded that these two receptors were implicated. However, the question remains unclear with regard to IL-8 and MCP-1. Thus, two different TLR2-dependent mechanisms may be involved and hence at least two different molecular patterns could interact with TLR2, one of them requiring the presence of CD14 (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and the other, directly or in combination with another co-receptor, interacting with TLR2 (IL-8 and MCP-1). This finding is not surprising since TLR2 has been shown to recognize several classes of pathogen-associated molecular patterns (55) and adapters other than CD14, possibly explaining this unusual ligand repertoire, have been shown to interact with TLR2 (20).

These results were then confirmed when TLR2^{-/-} and MyD88^{-/-} mouse macrophages were stimulated with *S. suis*. Indeed, TLR2^{-/-} mouse macrophages failed to produce a strong production of IL-6 compared to TLR2^{wt} macrophages. However, a lower level of IL-6 was still observed for TLR2^{-/-} macrophages. The fact that IL-6 production was completely abrogated for MyD88^{-/-} mouse macrophages shows that even if TLR2 is the principal receptor involved in *S. suis* recognition, other TLRs may play a minor role. This finding was already reported for different species among streptococci. Indeed, Henneke *et al.* found that TLR2 genetically-deficient mouse macrophages did not demonstrate a significantly altered cellular response to whole GBS as compared with normal cells (17). However, the presence of MyD88 was required, suggesting the involvement of other TLRs. These results were then confirmed by Mancuso *et al.* (31) who showed that MyD88 deficiency was associated with a more profound inability to either control infection or produce cytokine responses relative to TLR2 deficiency in a mouse model. Knapp *et al.* demonstrated that TLR2 is required *in vitro* for responsiveness to *S. pneumoniae* but was not sufficient *in vivo* to promote an uncompromised antibacterial defense against *S. pneumoniae* (25), suggesting that other mediators could compensate the

lack of TLR2. In addition, Khan *et al.* observed that wild-type and TLR2^{-/-} spleen cells from mice secreted equivalent amounts of cytokines (23) when they were stimulated by different doses of *S. pneumoniae*, whereas MyD88^{-/-} spleen cells failed to secrete any cytokines at any doses of *S. pneumoniae*. However, our data suggest a greater role of TLR2 for *S. suis* compared to *S. pneumoniae* since we were still able to observe an impairment in IL-6 production with TLR2^{-/-} macrophages at a comparable dose of *S. suis* bacteria. One of the most striking features of our results is the high level of MCP-1 released by TLR2^{-/-} mouse macrophages. As neutralization of human THP-1 cells by anti-TLR2 MAb resulted in a relative decrease in MCP-1 production, we were still able to observe the production of MCP-1 with TLR2^{-/-} mouse macrophages and a profound but not complete diminution of MCP-1 release with MyD88^{-/-} mouse macrophages. This finding has already been reported for the stimulation of primary microglia from TLR2^{-/-} mice by *Staphylococcus aureus* (24). Taken together, these data suggest that at least three different pathways are involved in MCP-1 production, a major one which involves TLR2, a second that involves other TLRs and finally a third that is MyD88-, and by extension, TLR-independent. This finding was strengthened by the observation that purified CPS itself promotes the release by THP-1 cells of MCP-1 but not the four other cytokines and chemokine studied. MCP-1 is an important regulator of leukocyte recruitment to sites of inflammation and has already been reported to destabilize the integrity of the BBB. Indeed, Song *et al.* showed that MCP-1 can alter the tight junction-associated proteins by promoting vasoactive effects that link to changes in endothelial junction integrity (44). Thus, the capacity of *S. suis* to induce the release of MCP-1 by different pathways could be an advantage and thus one of the mechanisms used by *S. suis* to cross the BBB, gain access to the CNS and subsequently to cause the disease. Indeed, even moderate weakening of the highly restrictive tight-junctions may be sufficient to allow for marginating leukocytes to easily extend an anchoring pseudopod and traverse the inter-endothelial cleft.

Comparison between the wild-type strain and its unencapsulated mutant did not show any differences in the capacity of interacting with TLR2 or TLR4 and of

inducing the release of cytokines and chemokines that result from this recognition. The B218 mutant was able to modulate the expression of TLR2 and CD14 (but not TLR4) in the same manner as its parental strain. In addition, the unencapsulated mutant induced, with the exception of MCP-1 for human macrophages, a comparable or even higher amount of the four other cytokines studied. Taken together, these results suggest that the CPS masks the bacteria from the cell surface and thus interferes rather than interacts with TLR2 (which is in agreement with its antiphagocytic properties). This finding is supported by a report which showed that *Neisseria meningitidis* engages a TLR4- and TLR2-dependent pro-inflammatory activity with or without the presence of its capsule (35). These results were confirmed with TLR2^{-/-} and MyD88^{-/-} mouse macrophages, where no differences were observed between the wild-type strain and its unencapsulated mutant in the capacity to stimulate the release of IL-6 and MCP-1. Altogether, these results elucidate the role of the cell wall as the most important mediator of cytokine production by *S. suis*. Indeed, the cell wall alone was able to modulate the expression of TLR2 and CD14 as the CPS did but was the only purified component studied able to induce the production by THP-1 cells of all five tested cytokines and chemokines. In addition, the cell wall induced a weak level of IL-6 and MCP-1 with MyD88^{wt} mouse macrophages and less or not at all with MyD88^{-/-} macrophages, and a consistent production of MCP-1 both with TLR2^{-/-} and TLR2^{wt} mouse macrophages. Thus, the cell wall seems to be involved in the recognition of *S. suis* by TLR2 as it has already been demonstrated with other pathogens (57). However, what compounds of the cell wall are involved remains controversial. Indeed, previous reports (7, 24) showed that peptidoglycan is implicated in the activation of the innate immune response although Travassos *et al.* showed that this PGN-dependent activation was due to contamination by LTA (49), suggesting that LTA is the molecule recognized by TLR2. In addition, since TLR2^{-/-}, but not MyD88^{-/-} mouse macrophages secrete MCP-1 after stimulation with purified cell wall, our results strongly suggest that other TLRs may interact with the cell wall. It would be, therefore, interesting to further investigate the role of the cell surface molecules of *S. suis* which could interact with and activate TLR2 or other TLRs.

In addition, it appears to be crucial to understand what is happening in the CNS during *S. suis* infection. It is accepted that TLR gene products are expressed in the CNS and that they can rapidly activate the innate immune response to eliminate foreign pathogens (37). Indeed, Kieilan *et al.* showed that TLR2 plays a major role in the recognition of *S. aureus* in primary astrocytes (24), however, other receptors could mediate the recognition of Gram-positive PAMPs by macrophages and Koedel *et al.* established that MyD88-deficient mice showed a strongly compromised inflammatory reaction to *S. pneumoniae* infection within the CNS (28).

To conclude, this work is a first step in the understanding of the mechanisms used to recognize the presence of *S. suis* in an infected host. *S. suis* is mainly recognized by TLR2, in combination or not with CD14 and this interaction results in the liberation of pro-inflammatory mediators. Nevertheless, as yet undefined mechanisms and receptors (including other TLRs) may mediate the recognition of this pathogen by macrophages and participate in the activation of an immune response.

REFERENCES

1. **Akira, S.** 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**:5-11.
2. **Akira, S., and H. Hemmi.** 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* **85**:85-95.
3. **Akira, S., and K. Takeda.** 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**:499-511.
4. **Al-Numani, D., M. Segura, M. Dore, and M. Gottschalk.** 2003. Up-regulation of ICAM-1, CD11a/CD18 and CD11c/CD18 on human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *Clin Exp Immunol* **133**:67-77.
5. **Benga, L., R. Goethe, M. Rohde, and P. Valentin-Weigand.** 2004. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol* **6**:867-881.
6. **Beutler, B.** 2003. Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**:609-628.
7. **Bieneman, A. P., K. L. Chichester, Y. H. Chen, and J. T. Schroeder.** 2005. Toll-like receptor 2 ligands activate human basophils for both IgE-dependent and IgE-independent secretion. *J Allergy Clin Immunol* **115**:295-301.
8. **Blasi, E., A. Mucci, R. Neglia, F. Pezzini, B. Colombari, D. Radzioch, A. Cossarizza, E. Lugli, G. Volpini, G. Del Giudice, and S. Peppoloni.** 2005. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**:69-79.
9. **Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144** (Pt 2):325-332.
10. **Charland, N., M. Kobisch, B. Martineau-Doize, M. Jacques, and M. Gottschalk.** 1996. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to

phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. FEMS Immunol Med Microbiol **14**:195-203.

11. **del Campo Sepulveda, E. M., E. Altman, M. Kobisch, S. D'Allaire, and M. Gottschalk.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. Vet Microbiol **52**:113-125.

12. **Feterowski, C., A. Novotny, S. Kaiser-Moore, P. F. Muhlradt, T. Rossmann-Bloeck, M. Rump, B. Holzmann, and H. Weighardt.** 2005. Attenuated pathogenesis of polymicrobial peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation. Int Immunol **17**:1035-1046.

13. **Fukao, T., and S. Koyasu.** 2003. PI3K and negative regulation of TLR signaling. Trends Immunol **24**:358-363.

14. **Giambartolomei, G. H., A. Zwerdling, J. Cassataro, L. Bruno, C. A. Fossati, and M. T. Philipp.** 2004. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. J Immunol **173**:4635-4642.

15. **Gottschalk, M., and M. Segura.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Vet Microbiol **76**:259-272.

16. **Hajishengallis, G., R. I. Tapping, M. H. Martin, H. Nawar, E. A. Lyle, M. W. Russell, and T. D. Connell.** 2005. Toll-like receptor 2 mediates cellular activation by the B subunits of type II heat-labile enterotoxins. Infect Immun **73**:1343-1349.

17. **Henneke, P., O. Takeuchi, J. A. van Strijp, H. K. Guttormsen, J. A. Smith, A. B. Schromm, T. A. Espevik, S. Akira, V. Nizet, D. L. Kasper, and D. T. Golenbock.** 2001. Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci. J Immunol **167**:7069-7076.

18. **Heumann, D., C. Barras, A. Severin, M. P. Glauser, and A. Tomasz.** 1994. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. Infect Immun **62**:2715-2721.

19. **Hill, J. E., M. Gottschalk, R. Brousseau, J. Harel, S. M. Hemmingsen, and S. H. Goh.** 2005. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* **107**:63-69.
20. **Hoebe, K., P. Georgel, S. Rutschmann, X. Du, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, L. Shamel, T. Hartung, U. Zahringer, and B. Beutler.** 2005. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**:523-527.
21. **Janssens, S., and R. Beyaert.** 2003. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* **16**:637-646.
22. **Kaufmann, A., P. F. Muhlradt, D. Gemsa, and H. Sprenger.** 1999. Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by *Mycoplasma fermentans*-derived lipoprotein MALP-2. *Infect Immun* **67**:6303-6308.
23. **Khan, A. Q., Q. Chen, Z. Q. Wu, J. C. Paton, and C. M. Snapper.** 2005. Both innate immunity and type 1 humoral immunity to *Streptococcus pneumoniae* are mediated by MyD88 but differ in their relative levels of dependence on toll-like receptor 2. *Infect Immun* **73**:298-307.
24. **Kielian, T., N. Esen, and E. D. Bearden.** 2005. Toll-like receptor 2 (TLR2) is pivotal for recognition of *S. aureus* peptidoglycan but not intact bacteria by microglia. *Glia* **49**:567-576.
25. **Knapp, S., C. W. Wieland, C. van 't Veer, O. Takeuchi, S. Akira, S. Florquin, and T. van der Poll.** 2004. Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol* **172**:3132-3138.
26. **Kobayashi, K., L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, and R. A. Flavell.** 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**:191-202.
27. **Kobisch, M., M. Gottschalk, P. Morvan, R. Cabriole, G. Bénévent, and J. P. Joly.** 1995. Experimental infection of SPF piglets with *Streptococcus suis* serotype 2. *J. Rech. Porcine Fr.* **27**:97-102.
28. **Koedel, U., T. Rupprecht, B. Angele, J. Heesemann, H. Wagner, H. W. Pfister, and C. J. Kirschning.** 2004. MyD88 is required for mounting a robust

host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain* **127**:1437-1445.

29. **Kopp, E., and R. Medzhitov.** 2003. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**:396-401.

30. **Malley, R., P. Henneke, S. C. Morse, M. J. Cieslewicz, M. Lipsitch, C. M. Thompson, E. Kurt-Jones, J. C. Paton, M. R. Wessels, and D. T. Golenbock.** 2003. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1966-1971.

31. **Mancuso, G., A. Midiri, C. Beninati, C. Biondo, R. Galbo, S. Akira, P. Henneke, D. Golenbock, and G. Teti.** 2004. Dual role of TLR2 and myeloid differentiation factor 88 in a mouse model of invasive group B streptococcal disease. *J Immunol* **172**:6324-6329.

32. **Medzhitov, R.** 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**:135-145.

33. **Moreillon, P., and P. A. Majcherczyk.** 2003. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis* **35**:632-641.

34. **Muneta, Y., H. Uenishi, R. Kikuma, K. Yoshihara, Y. Shimoji, R. Yamamoto, N. Hamashima, Y. Yokomizo, and Y. Mori.** 2003. Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *J Interferon Cytokine Res* **23**:583-590.

35. **Pridmore, A. C., G. A. Jarvis, C. M. John, D. L. Jack, S. K. Dower, and R. C. Read.** 2003. Activation of toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4/MD2 by *Neisseria* is independent of capsule and lipooligosaccharide (LOS) sialylation but varies widely among LOS from different strains. *Infect Immun* **71**:3901-3908.

36. **Raetz, C. R., and C. Whitfield.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**:635-700.

37. **Rivest, S.** 2003. Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* **17**:13-19.

38. **Segura, M., and M. Gottschalk.** 2004. Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. *Front Biosci* **9**:1157-1188.

39. **Segura, M., M. Gottschalk, and M. Olivier.** 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* **72**:5322-5330.
40. **Segura, M., J. Stankova, and M. Gottschalk.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**:4646-4654.
41. **Segura, M., N. Vadeboncoeur, and M. Gottschalk.** 2002. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol* **127**:243-254.
42. **Shimosato, T., M. Tohno, H. Kitazawa, S. Katoh, K. Watanabe, Y. Kawai, H. Aso, T. Yamaguchi, and T. Saito.** 2005. Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. *Immunol Lett* **98**:83-89.
43. **Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits.** 1999. Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* **67**:1750-1756.
44. **Song, L., and J. S. Pachter.** 2004. Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* **67**:78-89.
45. **Sugawara, S., S. Yang, K. Iki, J. Hatakeyama, R. Tamai, O. Takeuchi, S. Akashi, T. Espevik, S. Akira, and H. Takada.** 2001. Monocytic cell activation by Nonendotoxic glycoprotein from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 is mediated by toll-like receptor 2. *Infect Immun* **69**:4951-4957.
46. **Takeda, K., and S. Akira.** 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**:1-14.
47. **Tamai, R., S. Sugawara, O. Takeuchi, S. Akira, and H. Takada.** 2003. Synergistic effects of lipopolysaccharide and interferon-gamma in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-

regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression. *J Endotoxin Res* **9**:145-153.

48. **Tohno, M., T. Shimosato, H. Kitazawa, S. Katoh, I. D. Iliev, T. Kimura, Y. Kawai, K. Watanabe, H. Aso, T. Yamaguchi, and T. Saito.** 2005. Toll-like receptor 2 is expressed on the intestinal M cells in swine. *Biochem Biophys Res Commun* **330**:547-554.

49. **Travassos, L. H., S. E. Girardin, D. J. Philpott, D. Blanot, M. A. Nahori, C. Werts, and I. G. Boneca.** 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* **5**:1000-1006.

50. **Tuomanen, E., A. Tomasz, B. Hengstler, and O. Zak.** 1985. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* **151**:535-540.

51. **Vadeboncoeur, N., M. Segura, D. Al-Numani, G. Vanier, and M. Gottschalk.** 2003. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**:49-58.

52. **Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**:1441-1449.

53. **Wang, J. H., M. Doyle, B. J. Manning, Q. Di Wu, S. Blankson, and H. P. Redmond.** 2002. Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with suppression of toll-like receptor 2 expression. *J Biol Chem* **277**:36068-36075.

54. **Weber, J. R., P. Moreillon, and E. I. Tuomanen.** 2003. Innate sensors for Gram-positive bacteria. *Curr Opin Immunol* **15**:408-415.

55. **Wetzler, L. M.** 2003. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine* **21 Suppl 2**:S55-60.

56. **Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison.** 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**:1431-1433.

57. **Yoshimura, A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski, and D. Golenbock.** 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* **163**:1-5.
58. **Zhang, F. X., C. J. Kirschning, R. Mancinelli, X. P. Xu, Y. Jin, E. Faure, A. Mantovani, M. Rothe, M. Muzio, and M. Arditi.** 1999. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* **274**:7611-7614.

LEGENDS

FIG. 1. *S. suis* modulates the expression of TLR2 and CD14 mRNA, but not TLR4 mRNA. THP-1 cells (5×10^5 cells/ml) were incubated either with medium alone, heat-killed *S. suis* strain 31533 (10^9 CFU/ml), strain B218 (10^9 CFU/ml), LPS (50 ng/ml) or MALP-2 (10 ng/ml) used as positive controls for TLR4 and TLR2 respectively. At different time intervals, total RNA was extracted and TLR2, CD14, TLR4 mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The results are representative of three independent experiments.

FIG. 2. Purified components of *S. suis* modulate the expression of TLR2 and CD14 mRNA in the same manner as whole bacteria. (A) Comparative study of TLR2 mRNA expression of THP-1 cells (5×10^5 cells/ml) alone or stimulated with heat-killed *S. suis* strain 31533 (10^9 CFU/ml), heat-killed *S. suis* unencapsulated mutant B218 (10^9 CFU/ml), purified CPS (100 μ g/ml), purified cell wall (150 μ g/ml) and MALP-2 (10 ng/ml, used as positive control) at 30 minutes, 8 and 24 hours. (B) THP-1 cells ($5 \cdot 10^5$ cells/ml) stimulated for 24 hours with heat-killed *S. suis* 31533 (10^9 CFU/ml), heat-killed *S. suis* unencapsulated B218 mutant (10^9 CFU/ml), CPS (100 μ g/ml), cell wall (150 μ g/ml) and LPS (50 ng/ml, used as positive control). The results are representative of two independent experiments.

FIG. 3. Differences in cytokine production between the wild-type strain and the unencapsulated mutant. Time course production of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-8 (D) and MCP-1 (E) by THP-1 cells ($5 \cdot 10^5$ cells/ml) stimulated with heat-killed *S. suis* 31533 strain (10^9 CFU/ml), unencapsulated B218 mutant (10^9 CFU/ml). Culture supernatant were harvested at different time intervals and assayed for cytokine production by ELISA, DATA are expressed as mean \pm SD (in pg/ml).

FIG. 4. Purified components of *S. suis* differently induce the release of selected pro-inflammatory cytokines. Comparative study of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-8 (D) and MCP-1 (E) production by THP-1 cells ($5 \cdot 10^5$ cells/ml) stimulated with

heat-killed *S. suis* 31533 (10^9 CFU/ml), unencapsulated B218 mutant (10^9 CFU/ml), CPS (100 μ g/ml), cell wall (150 μ g/ml) and LPS (50 ng/ml, used as positive control).

FIG. 5. Effect of anti-TLRs MAbs on cytokine production by *S. suis*. THP-1 cells were pretreated for 1 h with medium only or with 15 μ g/ml concentration of MAb to TLR2 or TLR4 or an equal concentration of IgG2a isotype control. The cells were then stimulated for 8 h with heat-killed *S. suis* 31533 (10^9 CFU/ml), *S. suis* B218 (10^9 CFU/ml) and cell wall (150 μ g/ml). To evaluate the degree of effectiveness of the anti-TLRs MAbs used, THP-1 cells were also stimulated with LPS (50 ng/ml) or MALP-2 (10 ng/ml). Induction of TNF- α (A and F), IL-1 β (B and G), IL-6 (C and H), IL-8 (D and I) and MCP-1 (E and J) was assayed by ELISA. Data are expressed as means and standard deviations of three independent experiments.

FIG. 6. Bone-marrow derived macrophages from TLR2^{-/-} and MyD88^{-/-} exhibit a defective response in IL-6 and, to a lesser extent, MCP-1 production in response to *in vitro* stimulation with heat-killed *S. suis* when compared to wild-type controls. Macrophages ($5 \cdot 10^5$ cells/ml) from wild-type, TLR2^{-/-}, and MyD88^{-/-} mice were incubated with heat-killed *S. suis* 31533 (10^9 CFU/ml), heat-killed *S. suis* B218 (10^9 CFU/ml) or cell wall (150 μ g/ml) for 12 h. LPS (50 ng/ml) and MALP-2 (10 ng/ml) were used as positive controls for TLR4 and TLR2 respectively. Concentrations of IL-6 (A and C) and MCP-1 (B and D) were measured by ELISA titration of supernatants. Data are expressed as means and standard deviations of three independent experiments.

Figure 1

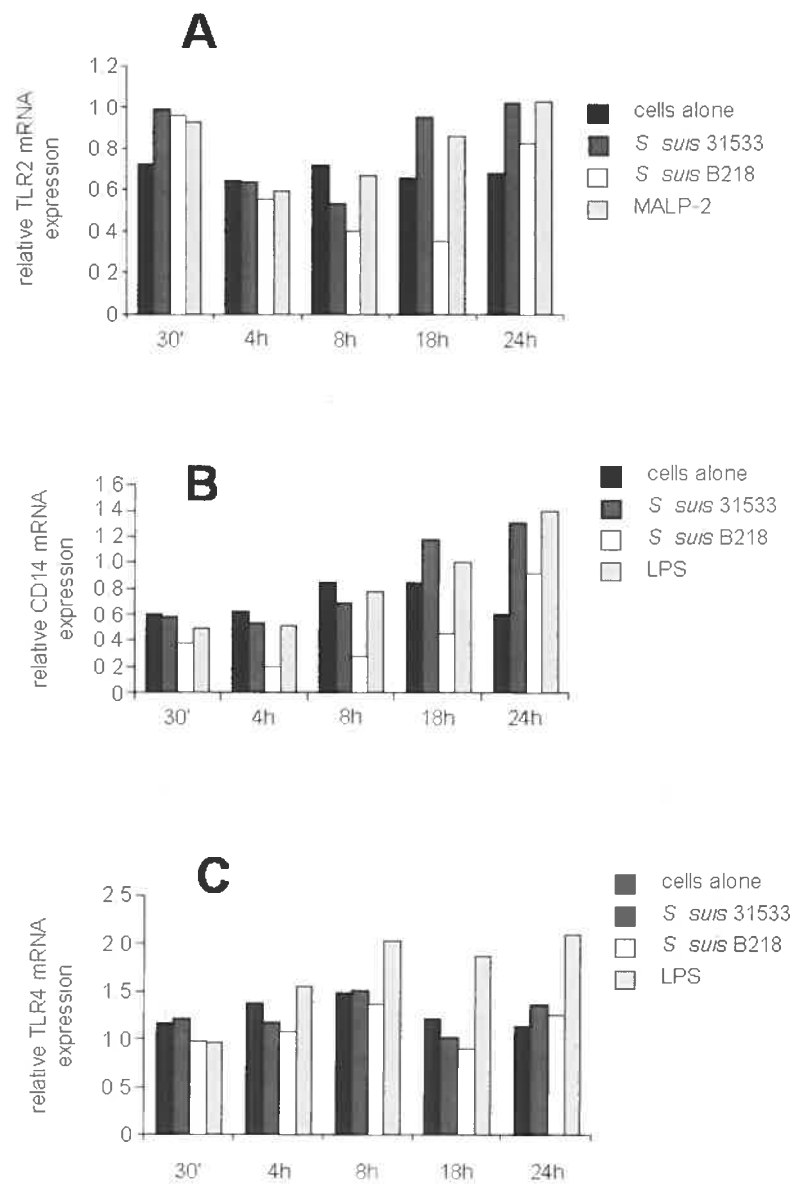


Figure 2

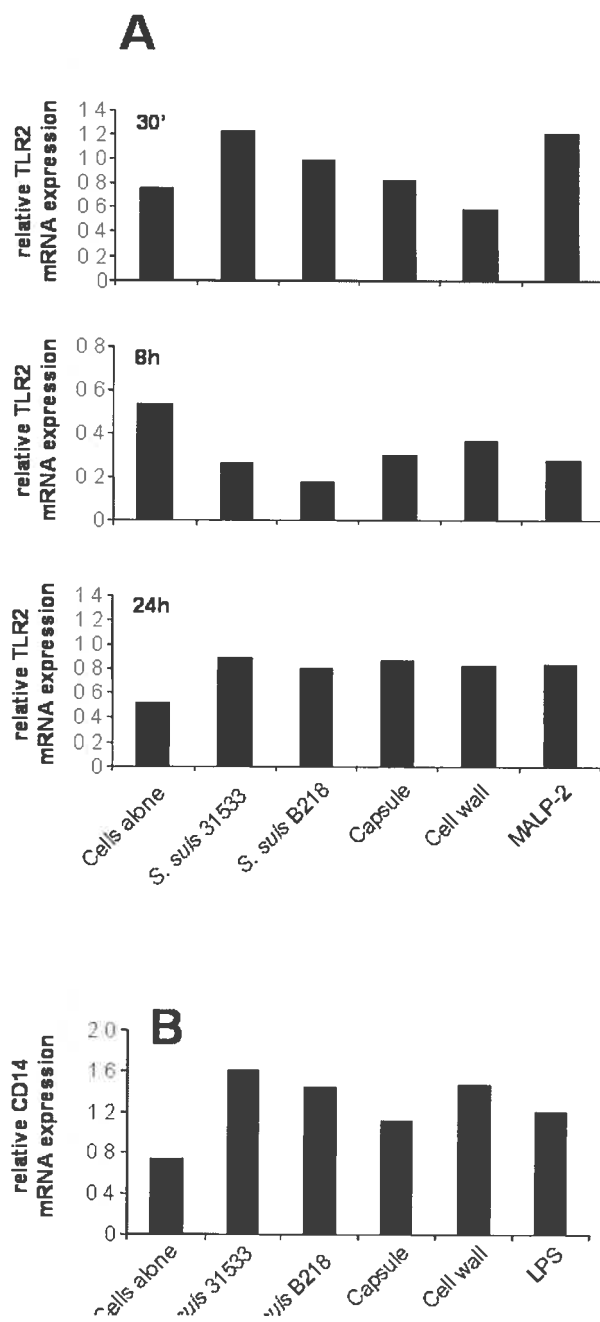


Figure 3

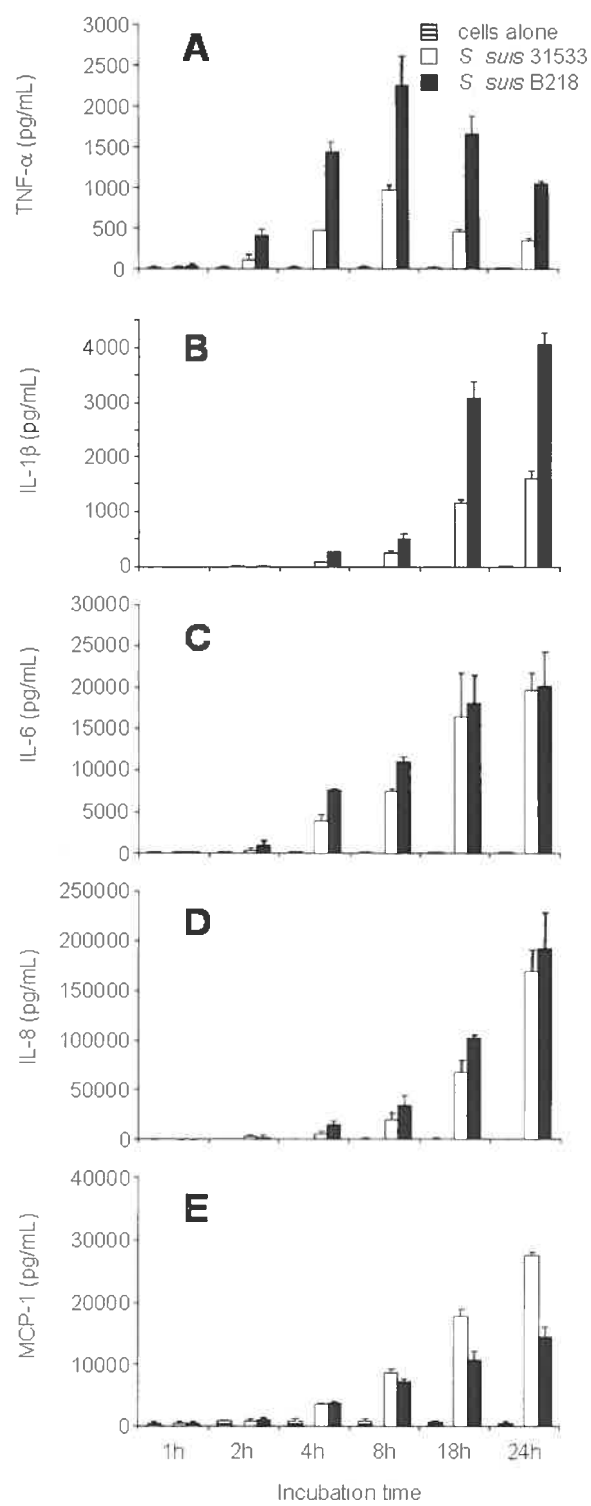


Figure 4

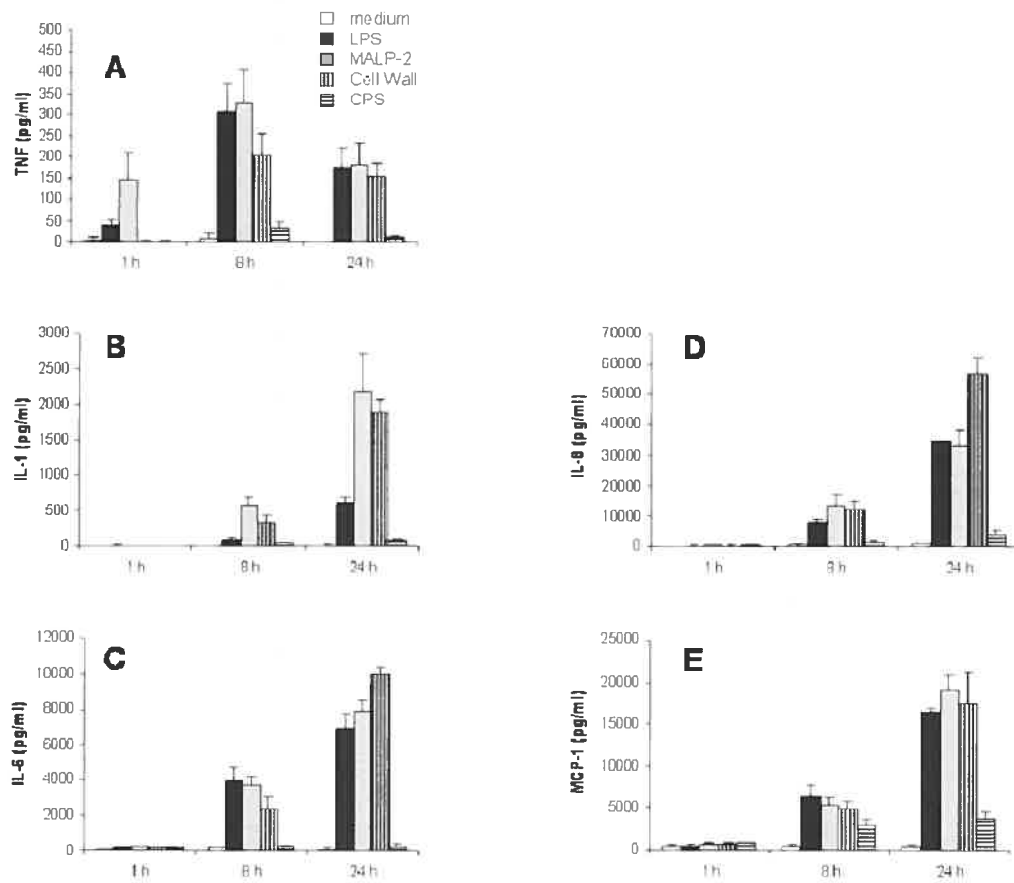


Figure 5

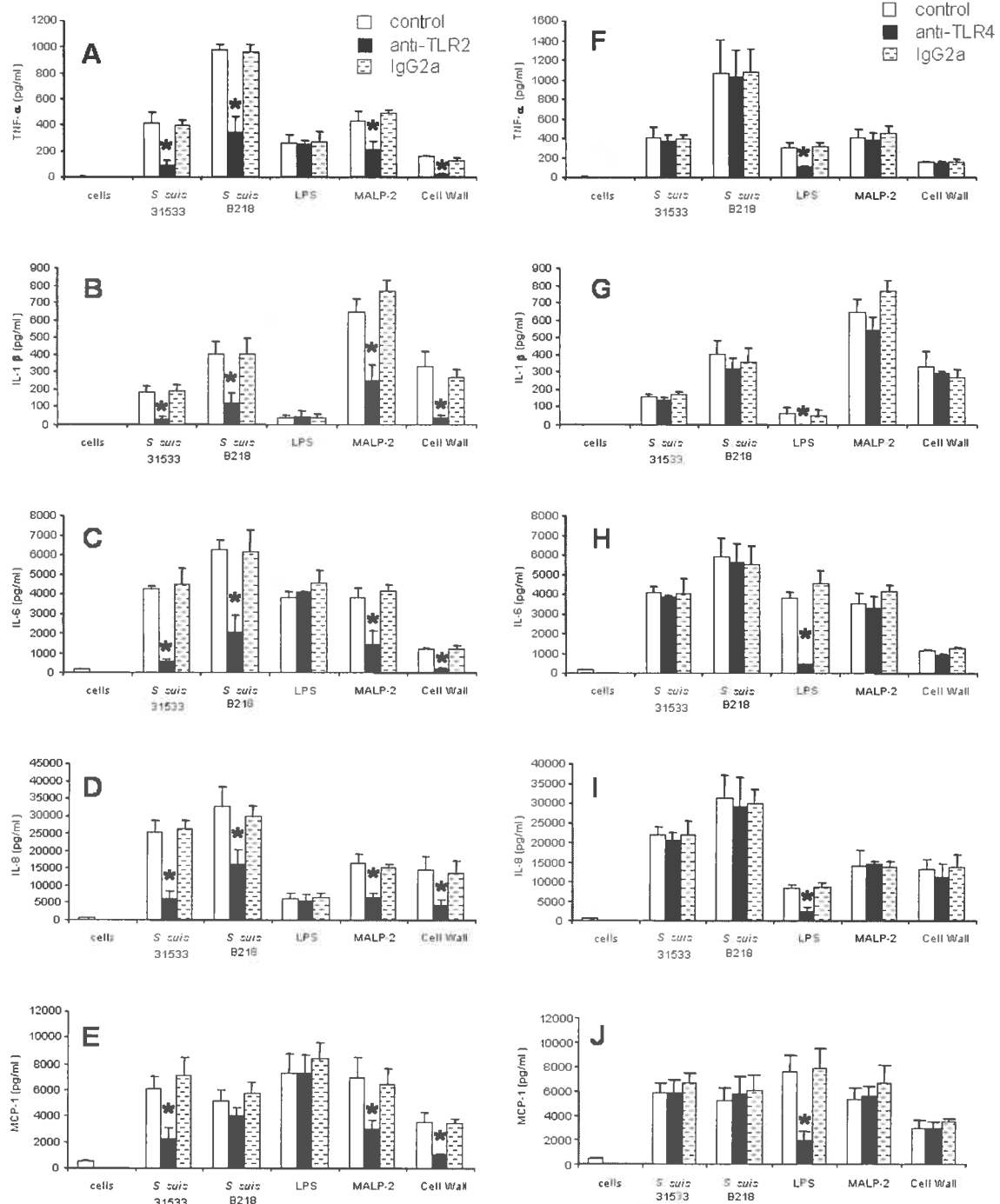
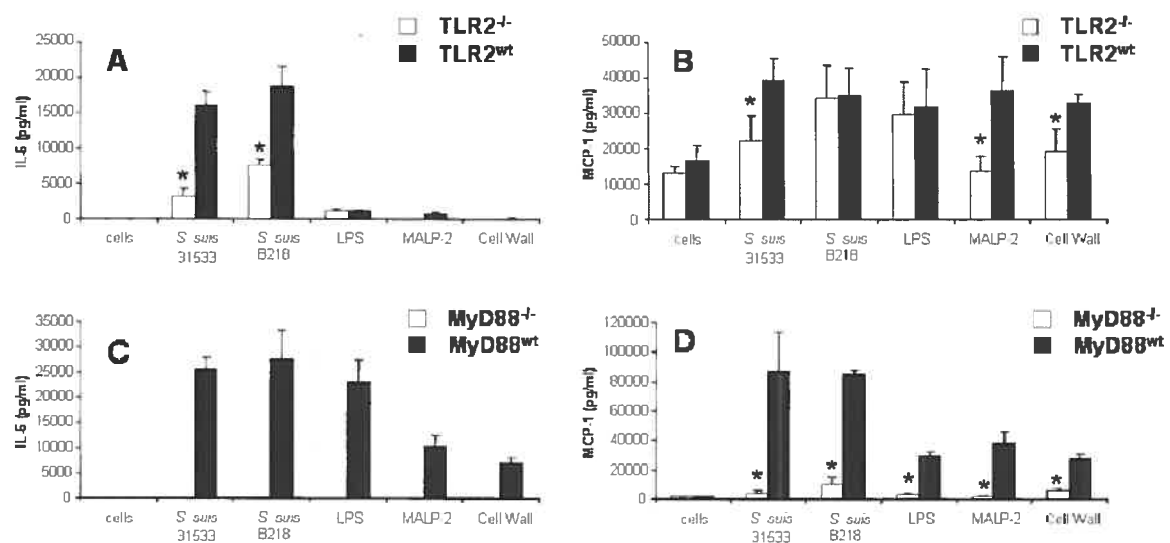


Figure 6



IV- DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS ET CONCLUSION

S. suis est une bactérie d'importance majeure dans l'industrie porcine. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire d'approfondir les connaissances sur les mécanismes impliqués lors d'une infection par ce pathogène. Un des faits les plus remarquables durant une infection à *S. suis* est le développement de la méningite (Gottschalk and Segura 2000). Cette infection se manifeste par des signes cliniques qui ont pour origine le développement d'une réponse inflammatoire au niveau du SNC, provoquant ainsi l'augmentation de la pression intracrânienne. De ce fait, la compréhension des voies utilisées par *S. suis* pour induire une réponse inflammatoire, en particulier dans le SNC, s'avère indispensable si l'on veut développer de nouvelles stratégies de lutte contre ce pathogène.

Des études réalisées au sein du laboratoire ont déjà montré que *S. suis* induit chez différentes lignées de monocytes et de cellules endothéliales la libération de cytokines, chimiokines ainsi que l'expression de molécules intervenant dans l'adhésion cellulaire (Segura, Stankova et al. 1999; Segura, Vadeboncoeur et al. 2002; Al-Numani, Segura et al. 2003; Vadeboncoeur, Segura et al. 2003). En revanche, les mécanismes de reconnaissance de *S. suis* à l'origine de cette libération restent encore non compris. Récemment, il a été montré que les mécanismes liés à la réponse innée font intervenir une famille de récepteurs identifiés comme les "Toll-Like Receptors" (TLRs). Onze TLRs ont été décrits chez l'homme parmi lesquels deux, TLR2 et TLR4, sont respectivement impliqués dans la reconnaissance des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Il nous est donc paru intéressant d'étudier le rôle de ces deux TLRs lors de la stimulation de macrophages par *S. suis*.

Comme il a déjà été montré, *S. suis* induit la sécrétion de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et MCP-1 par les cellules de l'hôte en fonction du temps d'incubation (Segura, Vadeboncoeur et al. 2002). Notre étude montre que cette libération de cytokines et chimiokines par une lignée de monocytes humains s'accompagne aussi de changements dans le niveau d'expression de TLR2 et de CD14; en revanche, *S. suis* ne semble pas affecter le taux relatif de transcrits de TLR4, contrairement à une stimulation par le LPS qui active sa transcription 4 heures après la stimulation des

cellules. Si la quantité d'ARNm ne reflète pas directement le nombre de récepteurs, il a déjà été décrit chez cette lignée qu'une stimulation par des lipoprotéines bactériennes augmente la quantité de récepteurs TLR2 à la surface cellulaire 30 minutes après stimulation et que cette phase d'activation est suivie d'une diminution observée 2 h après stimulation (Wang, Doyle et al. 2002). Les résultats obtenus durant nos travaux montrent un mécanisme comparable au niveau transcriptomique. En effet, 30 minutes après induction, l'expression de TLR2 est augmentée et 2 heures après, le taux relatif de transcrit est inférieur à celui observé chez des cellules non stimulées.

En ce qui concerne la phase d'inhibition, il ne paraît pas surprenant d'observer des phénomènes de tolérances immunes aussi au niveau de la quantité de récepteurs à l'origine du signal qui active la réponse inflammatoire. En effet, si des quantités de cytokines pro-inflammatoires sont nécessaires à une activité antibactérienne efficace, un excès dans cette réponse est à l'inverse délétère pour différents organes et peut mener à un choc septique. Plusieurs protéines ont ainsi été identifiées comme diminuant la quantité de cytokines pro-inflammatoires (Akira and Takeda 2004). Parmi ces molécules, IRAK-M est une protéine exprimée uniquement chez les monocytes et macrophages et dont la synthèse est activée à la suite de la stimulation par un des ligands des TLRs (Kobayashi, Hernandez et al. 2002). Ainsi, en comparant des souris sauvages à des souris génétiquement déficientes pour IRAK-M, il a été montré que ces dernières présentent une réponse accrue après inoculation de *Salmonella typhimurium*, due à un signalement non contrôlé via les TLRs, et les rendant ainsi incapables de développer des mécanismes de tolérance lors de stimulations répétées (Kobayashi, Hernandez et al. 2002). ST2 est une autre molécule impliquée dans la régulation négative des TLRs. Feterowski *et al.* ont en effet observé qu'un pré-traitement par MALP-2 chez des souris provoque une atténuation de la réponse inflammatoire à la suite d'une septicémie et que des souris déficientes en cette protéine présentent une production accrue en cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'un défaut dans la tolérance immune au LPS (Feterowski, Novotny et al. 2005). En ce qui concerne *S. suis*, les mécanismes impliqués durant cette phase d'inhibition ne sont pas encore connus. Il pourrait de

ce fait être intéressant d'étudier l'effet d'un blocage de l'une de ces protéines inhibitrices lors de la stimulation de macrophages par *S. suis*.

En prolongeant la stimulation des cellules THP-1 jusqu'à 24 heures, nous avons pu observer l'apparition d'une seconde phase d'activation commune à TLR2 et à CD14. CD14 est une protéine membranaire, ancrée via un groupement glycosylphosphatidylinositol, dont l'implication partielle dans la libération de cytokines a déjà été montrée lors d'une stimulation des cellules THP-1 par *S. suis* (Segura, Vadeboncoeur et al. 2002). Dans la mesure où le transcrit de CD14 n'est pas affecté de façon précoce, il est à supposer que les gènes de TLR2 et CD14 sont régulés de manière indépendante. En ce qui concerne le CD14, l'augmentation du taux relatif de transcrits à 24 heures peut s'expliquer par la nécessité de pré-activer les cellules THP-1 à l'IFN- γ avant de les stimuler par *S. suis*. Ainsi, ce traitement pourrait activer la transcription du gène à l'origine de la synthèse de CD14 et permettre ainsi à ces cellules de répondre de façon adéquate à une stimulation par *S. suis*.

En groupant ces résultats, il apparaît donc qu'une stimulation des cellules THP-1 par *S. suis* provoque une variation du niveau de transcription des gènes impliqués dans la synthèse des récepteurs et co-récepteurs pouvant être à l'origine, au moins en partie, de cette réponse inflammatoire.

Afin d'étudier plus en détail le rôle de TLR2 et/ou de TLR4 dans le déclenchement d'une réponse inflammatoire liée à *S. suis*, nous avons voulu voir l'effet d'une neutralisation de ces récepteurs sur la libération de cytokines. Par l'utilisation d'un anticorps monoclonal (Ac) purifié dirigé contre TLR4, il nous a été impossible d'observer une inhibition de la sécrétion de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et de MCP-1 en présence de la souche sauvage de *S. suis*. En revanche, une forte inhibition de la production de TNF- α , IL-1 β , IL-6, et, dans un plus faible rapport, d'IL-8 et de MCP-1 a été observée après neutralisation par l'Ac anti-TLR2. Ce résultat montre clairement que TLR2 est nécessaire à la reconnaissance de *S. suis* et, par conséquent, à la libération, au moins en partie, de toutes les cytokines et chimiokines testées durant cette étude. De plus, en combinant nos résultats à ceux

ayant montré que le CD14 était impliqué dans l'induction de la sécrétion de TNF- α , IL-1 β et IL-6 et partiellement dans celle de MCP-1 (et non d'IL-8) (Segura, Vadeboncoeur et al. 2002), nous en sommes arrivés à la conclusion qu'au moins deux mécanismes sont impliqués dans la cascade signalétique menant à une réponse inflammatoire provoquée par *S. suis*. D'une part, une voie qui nécessite l'intervention de TLR2 et du CD14 (cas de TNF- α , IL-1 β et IL-6, et partiellement de MCP-1) et, d'autre part, une seconde voie qui résulte de l'interaction entre *S. suis* et TLR2, seul ou en combinaison avec un co-récepteur autre que le CD14 (cas d'IL-8 et de MCP-1). De plus, ces différents mécanismes peuvent aussi être associés à des mécanismes d'amplification de la cascade signalétique par TNF- α et IL-1 β (Segura et al. 2002).

Suite à l'utilisation d'AcS neutralisants, nous avons voulu confirmer nos résultats à l'aide de macrophages provenant de souris génétiquement déficientes pour TLR2 ou MyD88. Nos résultats suggèrent un rôle important de TLR2 lors d'une infection causée par *S. suis*. En effet, en induisant les macrophages TLR2^{-/-} avec la souche sauvage de *S. suis*, nous avons observé que même si des quantités non négligeables d'IL-6 sont détectables, ces cellules se trouvent dans l'incapacité de sécréter cette cytokine dans des quantités comparables à celles pour la lignée contrôle. De plus, par l'utilisation de macrophages MyD88^{-/-}, nous avons été dans l'incapacité d'observer une quelconque production d'IL-6 après stimulation par *S. suis*.

En revanche, pour MCP-1, tout comme lors de la neutralisation des cellules THP-1 par un Ac anti-TLR2, nous avons encore été capable d'observer une sécrétion non négligeable de cette chimiokine chez la lignée murine TLR2^{-/-} et une profonde mais non totale inhibition avec la lignée MyD88^{-/-}. Ces observations ont déjà été décrites lors de la stimulation de microglia issues de souris TLR2^{-/-} par *S. aureus* (Kielian, Esen et al. 2005) et montrent que cette chimiokine peut être aussi induite par des mécanismes TLR-indépendants.

Ainsi, par comparaison entre les différentes lignées murines, nos résultats montrent que TLR2 est le TLR principalement impliqué *in vitro* dans la reconnaissance d'une souche capsulée de *S. suis* et dans l'activation d'une réponse inflammatoire

mais un degré supplémentaire de complexité peut être envisagée dans la mesure où d'autres voies d'activation peuvent s'additionner. Nos résultats sont ainsi en accord avec ce qui peut être trouvé dans la littérature. En effet, des études portant sur les interactions entre des streptocoques et des lignées de macrophages génétiquement déficientes pour TLR2 ou MyD88 ont permis de mieux comprendre la complexité des interactions entre ces bactéries et les cellules phagocytaires. Knapp *et al.* ont ainsi montré que TLR2 est requis *in vitro* dans la réponse à une infection causée par *S. pneumoniae* même s'il ne suffit pas *in vivo* pour éradiquer cette bactérie (Knapp, Wieland et al. 2004). En revanche, Khan *et al.* ont observé que, si des cellules de la rate prélevées chez des souris déficientes en MyD88 sont dans l'incapacité de répondre à *S. pneumoniae*, ces mêmes cellules provenant de souris TLR2^{-/-} sécrètent des quantités de cytokines similaires à celles de souris sauvages et ce, pour différentes doses bactériennes (Khan, Chen et al. 2005). Des résultats similaires ont été obtenus avec les streptocoques du groupe B. Henneke et al. ont ainsi montré qu'une déficience en TLR2 chez des souris n'altère pas une réponse cellulaire provoquée par les streptocoques du groupe B (Henneke, Takeuchi et al. 2001); en revanche, la présence de MyD88 semble requise, suggérant ainsi que d'autres TLRs peuvent compenser l'absence de TLR2. Selon le même principe, Mancuso *et al.* ont montré qu'une déficience pour MyD88 est associée à une plus grande incapacité à contrôler et à libérer des cytokines que ce qui est observé chez une souris génétiquement déficiente en TLR2 (Mancuso, Midiri et al. 2004).

MCP-1 est une chimiokine importante dans le recrutement des leucocytes aux sites d'inflammation et a aussi été impliquée dans la déstabilisation de la BBB. Song *et al.* ont ainsi montré que cette molécule pouvait altérer les protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées en favorisant des effets vasoactifs à l'origine de changements dans l'intégrité de ces jonctions entre les cellules endothéliales (Song et Pachter 2004). Ainsi, la capacité de *S. suis* à induire la libération de MCP-1 par différentes voies peut être un avantage certain et l'un des mécanismes utilisés par *S. suis* pour traverser la BBB, atteindre le SNC et y causer une inflammation à l'origine de la méningite. Cette hypothèse est d'autant plus renforcée que la libération de MCP-1 (tel qu'indiqué plus bas) semble

dépendre de la présence de la CPS polysaccharidique, à l'inverse de ce qui est observé pour les quatre autres cytokines et la chimiokine étudiées. Ainsi, la CPS contribue à la libération de cette chimiokine par des mécanismes TLR-indépendant (voir ci-après).

En ce qui concerne les composants de *S. suis* impliqués dans la reconnaissance cellulaire, la comparaison entre bactéries capsulée et non capsulée ne permet pas de faire ressortir de différences majeures dans la capacité à moduler l'expression de TLR2, CD14 et TLR4. En effet, le mutant non capsulé B218 module l'expression de TLR2 et CD14 (mais pas TLR4) de la même manière que ce qui est observé en présence de la souche parentale 31533. En revanche, ce mutant induit, à l'exception de MCP-1, des quantités comparables ou supérieures de TNF- α , IL-1 β , IL-6, et d'IL-8. Notre étude renforce donc plus un rôle antiphagocytaire de la CPS (masquant les protéines susceptibles d'être reconnues de la surface cellulaire) que celui d'activateur d'une réponse inflammatoire par un mécanisme TLR2-dépendant, comme cela a déjà été montré chez *Neisseria meningitidis* (Pridmore, Jarvis et al. 2003).

Par conséquent, la paroi bactérienne peut être regardée comme la composante majeure à l'origine d'une interaction avec TLR2 et de l'activation de la réponse inflammatoire. De plus, en utilisant des préparations de CPS et de paroi bactérienne purifiées, nous avons montré que ces deux composantes sont à l'origine d'une modulation de l'expression de TLR2 et CD14 mais que seule la paroi bactérienne induit la production de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et MCP-1 chez la lignée THP-1. Par ailleurs, chez un modèle murin, la paroi bactérienne induit aussi IL-6 et MCP-1 et cette induction est réduite chez les lignées MyD88^{-/-} et TLR2^{-/-} et bloquée par un anticorps anti-TLR2 chez les monocytes humains. En revanche, l'absence de CPS résulte en une inhibition de la production de MCP-1 comme il a déjà été observé pour des monocytes humains et des cellules endothéliales (résultats non publiés, Vadeboncoeur et al.). Etant donné que la paroi cellulaire est plus exposée dans le cas d'une bactérie non capsulée, il aurait été logique de s'attendre à une plus forte production de MCP-1. Or l'inverse a été observé. De plus, cette faible induction de

MCP-1 par la souche non-capsulée est étonnamment TLR2- et TLR4-indépendants mais MyD88-indépendant. Ces observations pourraient être dues à des modifications de la paroi cellulaire chez ce mutant et/ou à une induction par d'autres composants bactériens utilisant des TLRs autres que TLR2 et TLR4.

L'ensemble de ces résultats permet de mettre en évidence le rôle principal de TLR2 dans la reconnaissance de *S. suis* par les cellules phagocytaires de l'hôte. Cependant, d'autres mécanismes mal définis, et d'autres récepteurs (notamment d'autres TLRs) peuvent collaborer aussi à la reconnaissance de ce pathogène et participer à l'activation de la réponse innée. Malley *et al.* ont ainsi montré que TLR4 peut reconnaître la pneumolysine de *S. pneumoniae* et ainsi induire la sécrétion de TNF- α et IL-6 (Malley, Henneke et al. 2003). Du fait de l'appartenance de la suilysine à la même famille de toxines que la pneumolysine et dans la mesure où nos expériences ont été réalisées à l'aide de préparations de bactéries tuées par la chaleur, nous ne pouvons pas exclure l'existence *in vivo* d'autres mécanismes TLR4-dépendants pouvant s'ajouter dans l'induction d'une réponse inflammatoire.

Il est tout aussi intéressant de caractériser les mécanismes impliqués lors d'une infection à *S. suis in vivo*, et plus particulièrement au niveau du SNC. En effet, il est communément accepté que les TLRs sont exprimés dans le SNC et qu'ils peuvent activer rapidement une réponse immunitaire innée afin d'éliminer tout pathogène s'y trouvant. Kielian *et al.* ont ainsi montré que TLR2 joue un rôle majeur dans la reconnaissance de *S. aureus* chez des astrocytes (Esen, Tanga et al. 2004); en revanche, d'autres récepteurs présents à la surface des macrophages peuvent intervenir dans la reconnaissance de motifs présents chez des bactéries à Gram positif. De plus, Koedel *et al.* ont établi que des souris génétiquement déficientes pour MyD88 présentent des réactions inflammatoires fortement compromises suite à l'infection de *S. pneumoniae* au niveau du SNC (Koedel, Rupperecht et al. 2004). Par ailleurs, comme il a déjà été mentionné dans le cas de *S. pneumoniae* (Knapp, Wieland et al. 2004), les résultats obtenus *in vitro* nécessitent d'être validés *in vivo* afin de pouvoir développer des stratégies de lutte contre *S. suis*.

Finalement, il paraît nécessaire d'étudier le rôle des TLRs lors d'une infection à *S. suis* chez son hôte d'origine, *i.e.* le porc. Peu de données sont à ce jour disponibles concernant les TLRs chez cette espèce. En effet, seules trois études ont montré l'existence de mécanismes faisant intervenir TLR2 et TLR6 lors d'infections sur modèle porcin (Liu, Wang et al. 2001; Muneta, Uenishi et al. 2003; Tohno, Shimosato et al. 2005). Il paraît de ce fait intéressant de voir ce qu'il en est exactement avec *S. suis* lors du développement de la méningite.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de cette étude représentent une première étape dans la compréhension des mécanismes utilisés par les cellules de l'hôte pour sentir la présence de *S. suis* dans un hôte infecté. Ainsi, *S. suis* est reconnu par des mécanismes faisant intervenir TLR2 en combinaison ou non avec CD14 et cette reconnaissance est à l'origine de la libération des médiateurs de la réponse pro-inflammatoire observée lors d'une infection à *S. suis*.

V- BIBLIOGRAPHIE

(2005). "Outbreak associated with *Streptococcus suis* in pigs, China." Wkly Epidemiol Rec **80**(32): 269-70.

Adachi, O., T. Kawai, et al. (1998). "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function." Immunity **9**(1): 143-50.

Adam, R. A., T. Tenenbaum, et al. (2004). "Porcine choroid plexus epithelial cells induce *Streptococcus suis* bacteriostasis in vitro." Infect Immun **72**(5): 3084-7.

Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, et al. (2002). "Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments." Eur J Immunol **32**(7): 1958-68.

Akashi, S., R. Shimazu, et al. (2000). "Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages." J Immunol **164**(7): 3471-5.

Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.

Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.

Al-Numani, D., M. Segura, et al. (2003). "Up-regulation of ICAM-1, CD11a/CD18 and CD11c/CD18 on human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2." Clin Exp Immunol **133**(1): 67-77.

Aldridge, A. J. (2002). "Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome." Eur J Surg **168**(4): 204-14.

Allen, A. G., S. Bolitho, et al. (2001). "Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin." Infect Immun **69**(4): 2732-5.

Allgaier, A., R. Goethe, et al. (2001). "Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits." J Clin Microbiol **39**(2): 445-53.

Baele, M., K. Chiers, et al. (2001). "The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning." J Appl Microbiol **91**(6): 997-1003.

Baggiolini, M. (1995). "Activation and recruitment of neutrophil leukocytes." Clin Exp Immunol **101 Suppl 1**: 5-6.

Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1994). "Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines." Adv Immunol **55**: 97-179.

Baker, C. C. and M. D. Huynh (1995). "Sepsis in the critically ill patient." Curr Probl Surg **32**(12): 1013-83.

Bauer, S., C. J. Kirschning, et al. (2001). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9237-42.

Bell, J. K., G. E. Mullen, et al. (2003). "Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors." Trends Immunol **24**(10): 528-33.

Benga, L., R. Goethe, et al. (2004). "Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells." Cell Microbiol **6**(9): 867-81.

Berthelot-Herault, F., H. Morvan, et al. (2000). "Production of muraminidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France." Vet Res **31**(5): 473-9.

Beutler, B. and E. T. Rietschel (2003). "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." Nat Rev Immunol **3**(2): 169-76.

Boivin, A. and L. Mesrobian (1935). "Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries." Rev Immunol **1**: 553-69.

Bradley, J. R. and J. S. Pober (2001). "Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)." Oncogene **20**(44): 6482-91.

Brassard, J., M. Gottschalk, et al. (2004). "Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin." Vet Microbiol **102**(1-2): 87-94.

Brint, E. K., D. Xu, et al. (2004). "ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance." Nat Immunol **5**(4): 373-9.

Brisebois, L. M., R. Charlebois, et al. (1990). "Prevalence of *Streptococcus suis* in four to eight week old clinically healthy piglets." Can J Vet Res **54**(1): 174-7.

Burns, K., S. Janssens, et al. (2003). "Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4." J Exp Med **197**(2): 263-8.

Burns, K., F. Martinon, et al. (1998). "MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling." J Biol Chem **273**(20): 12203-9.

Byrd-Leifer, C. A., E. F. Block, et al. (2001). "The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol." Eur J Immunol **31**(8): 2448-57.

Calandra, T., P. Y. Bochud, et al. (2002). "Cytokines in septic shock." Curr Clin Top Infect Dis **22**: 1-23.

Campos, M. A., I. C. Almeida, et al. (2001). "Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite." J Immunol **167**(1): 416-23.

Casey, L. C. (2000). "Immunologic response to infection and its role in septic shock." Crit Care Clin **16**(2): 193-213.

Cavaillon, J. M., H. Muller-Alouf, et al. (1997). "Cytokines in streptococcal infections. An opening lecture." Adv Exp Med Biol **418**: 869-79.

Charland, N., J. Harel, et al. (1998). "Streptococcus suis serotype 2 mutants deficient in capsular expression." Microbiology **144** (Pt 2): 325-32.

Charland, N., M. Jacques, et al. (1997). "Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by Streptococcus suis serotypes 1, 2 and 1/2." Microbiology **143** (Pt 11): 3607-14.

Charland, N., J. T. Kellens, et al. (1995). "Agglutination of Streptococcus suis by sialic acid-binding lectins." J Clin Microbiol **33**(8): 2220-1.

Charland, N., M. Kobisch, et al. (1996). "Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of Streptococcus suis capsular type 2." FEMS Immunol Med Microbiol **14**(4): 195-203.

Charland, N., V. Nizet, et al. (2000). "Streptococcus suis serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells." Infect Immun **68**(2): 637-43.

Chatellier, S., M. Gottschalk, et al. (1999). "Relatedness of Streptococcus suis serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping." J Clin Microbiol **37**(2): 362-6.

Cleveland, M. G., J. D. Gorham, et al. (1996). "Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway." Infect Immun **64**(6): 1906-12.

Clifton-Hadley, F. A., T. J. Alexander, et al. (1986). "Monitoring herds for Streptococcus suis type 2: chance contamination of slaughter pigs." Vet Rec **118**(10): 274.

Cloutier, G., S. D'Allaire, et al. (2003). "Epidemiology of Streptococcus suis serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease." Vet Microbiol **97**(1-2): 135-51.

Couturier, C., N. Haeffner-Cavaillon, et al. (1991). "Binding sites for endotoxins (lipopolysaccharides) on human monocytes." J Immunol **147**(6): 1899-904.

Couturier, C., G. Jahns, et al. (1992). "Membrane molecules which trigger the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes." Eur J Immunol **22**(6): 1461-6.

Cuzzola, M., G. Mancuso, et al. (2000). "Human monocyte receptors involved in tumor necrosis factor responses to group B streptococcal products." Infect Immun **68**(2): 994-8.

Dalpke, A. H., S. Opper, et al. (2001). "Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs." J Immunol **166**(12): 7082-9.

de Greeff, A., H. Buys, et al. (2002). "Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of Streptococcus suis serotype 2." Infect Immun **70**(3): 1319-25.

De Kimpe, S. J., M. Kengatharan, et al. (1995). "The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus act in synergy to cause shock and multiple organ failure." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10359-63.

de Moor, C. E. (1963). "Septicaemic infections in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S and T." Antonie van Leeuwenhoek **29**: 272-280.

Dee, S. A., A. R. Carlson, et al. (1993). "Effect of management practices on the Streptococcus suis carrier rate in nursery swine." J Am Vet Med Assoc **203**(2): 295-9.

del Campo Sepulveda, E. M., E. Altman, et al. (1996). "Detection of antibodies against Streptococcus suis capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA." Vet Microbiol **52**(1-2): 113-25.

Devriese, L. A., J. Hommeez, et al. (1994). "Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs." J Appl Bacteriol **77**(1): 31-6.

Donsakul, K., C. Dejthevaporn, et al. (2003). "Streptococcus suis infection: clinical features and diagnostic pitfalls." Southeast Asian J Trop Med Public Health **34**(1): 154-8.

Dunne, A., M. Ejdeback, et al. (2003). "Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88." J Biol Chem **278**(42): 41443-51.

Dupas, D., M. Vignon, et al. (1992). "Streptococcus suis meningitis. A severe noncompensated occupational disease." J Occup Med **34**(11): 1102-5.

Dziarski, R. (2003). "Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system." Cell Mol Life Sci **60**(9): 1793-804.

Dziarski, R. and D. Gupta (2005). "Staphylococcus aureus peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation." Infect Immun **73**(8): 5212-6.

Dziarski, R., R. I. Tapping, et al. (1998). "Binding of bacterial peptidoglycan to CD14." J Biol Chem **273**(15): 8680-90.

Dziarski, R., A. J. Ulmer, et al. (2000). "Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria." Chem Immunol **74**: 83-107.

Elliott, S. D. (1966). "Streptococcal infection in young pigs. I. An immunochemical study of the causative agent (PM streptococcus)." J Hyg (Lond) **64**(2): 205-12.

Elliott, S. D. and J. Y. Tai (1978). "The type-specific polysaccharides of Streptococcus suis." J Exp Med **148**(6): 1699-704.

Enright, M. R., T. J. Alexander, et al. (1987). "Role of houseflies (*Musca domestica*) in the epidemiology of Streptococcus suis type 2." Vet Rec **121**(6): 132-3.

Esen, N., F. Y. Tanga, et al. (2004). "Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*." J Neurochem **88**(3): 746-58.

Esgleas, M., S. Lacouture, et al. (2005). "Streptococcus suis serotype 2 binding to extracellular matrix proteins." FEMS Microbiol Lett **244**(1): 33-40.

Evans, T. J. (1996). "The role of macrophages in septic shock." Immunobiology **195**(4-5): 655-9.

Feterowski, C., A. Novotny, et al. (2005). "Attenuated pathogenesis of polymicrobial peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation." Int Immunol **17**(8): 1035-46.

Fournier, B. and D. J. Philpott (2005). "Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system." Clin Microbiol Rev **18**(3): 521-40.

Gangur, V., N. P. Birmingham, et al. (2002). "Chemokines in health and disease." Vet Immunol Immunopathol **86**(3-4): 127-36.

Gao, J. J., Q. Xue, et al. (2001). "Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro." Infect Immun **69**(2): 751-7.

Gewirtz, A. T., T. A. Navas, et al. (2001). "Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression." J Immunol **167**(4): 1882-5.

Ginsburg, I. (2002). "Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation." Lancet Infect Dis **2**(3): 171-9.

Glauser, M. P. (1996). "The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock." Drugs **52 Suppl 2**: 9-17.

Golenbock, D. T., R. Y. Hampton, et al. (1991). "Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes." J Biol Chem **266**(29): 19490-8.

Gottschalk, M., R. Higgins, et al. (1991). "Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22." J Vet Diagn Invest **3**(1): 60-5.

Gottschalk, M., R. Higgins, et al. (1989). "Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*." J Clin Microbiol **27**(12): 2633-6.

Gottschalk, M., A. Lebrun, et al. (1998). "Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2." Can J Vet Res **62**(1): 75-9.

Gottschalk, M. and M. Segura (2000). "The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions." Vet Microbiol **76**(3): 259-72.

Gottschalk, M. G., S. Lacouture, et al. (1995). "Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin." Microbiology **141** (Pt 1): 189-95.

Guermontprez, P., L. Saveanu, et al. (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." Nature **425**(6956): 397-402.

Gupta, D., T. N. Kirkland, et al. (1996). "CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan." J Biol Chem **271**(38): 23310-6.

Haataja, S., K. Tikkanen, et al. (1993). "Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides." J Biol Chem **268**(6): 4311-7.

Hacker, H., R. M. Vabulas, et al. (2000). "Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6." J Exp Med **192**(4): 595-600.

Hamann, L., O. Kumpf, et al. (2004). "A coding mutation within the first exon of the human MD-2 gene results in decreased lipopolysaccharide-induced signaling." Genes Immun **5**(4): 283-8.

Han, S. H., J. H. Kim, et al. (2003). "Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2." Infect Immun **71**(10): 5541-8.

Hashimoto, C., K. L. Hudson, et al. (1988). "The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." Cell **52**(2): 269-79.

Hayashi, F., K. D. Smith, et al. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-103.

Haziot, A., E. Ferrero, et al. (1995). "CD14-deficient mice are exquisitely insensitive to the effects of LPS." Prog Clin Biol Res **392**: 349-51.

Heath, P. J. and B. W. Hunt (2001). "Streptococcus suis serotypes 3 to 28 associated with disease in pigs." Vet Rec **148**(7): 207-8.

Heil, F., P. Ahmad-Nejad, et al. (2003). "The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily." Eur J Immunol **33**(11): 2987-97.

Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.

Henderson, B., S. Poole, et al. (1996). "Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis." Microbiol Rev **60**(2): 316-41.

Henderson, B., S. Poole, et al. (1996). "Microbial/host interactions in health and disease: who controls the cytokine network?" Immunopharmacology **35**(1): 1-21.

Henneke, P., O. Takeuchi, et al. (2001). "Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci." J Immunol **167**(12): 7069-76.

Heppner, G. and W. D.W. (1965). "High susceptibility os strain A mice to endotoxin and endotoxin-red blood cell mixtures." J Bacteriol **90**: 696-703.

Hermann, C., I. Spreitzer, et al. (2002). "Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species--role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release." Eur J Immunol **32**(2): 541-51.

Higgins, R. and M. Gottschalk (2001). "Distribution of Streptococcus suis capsular types in 2000." Can Vet J **42**(3): 223.

Higgins, R., M. Gottschalk, et al. (1995). "Description of six new capsular types (29-34) of Streptococcus suis." J Vet Diagn Invest **7**(3): 405-6.

Hill, J. E., M. Gottschalk, et al. (2005). "Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*." Vet Microbiol **107**(1-2): 63-9.

Hoebe, K., P. Georgel, et al. (2005). "CD36 is a sensor of diacylglycerides." Nature **433**(7025): 523-7.

Hoshino, K., O. Takeuchi, et al. (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." J Immunol **162**(7): 3749-52.

Hui, A. C., K. C. Ng, et al. (2005). "Bacterial meningitis in Hong Kong: 10-years' experience." Clin Neurol Neurosurg **107**(5): 366-70.

Ingalls, R. R. and D. T. Golenbock (1995). "CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide." J Exp Med **181**(4): 1473-9.

Ishitani, T., G. Takaesu, et al. (2003). "Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling." Embo J **22**(23): 6277-88.

Iwaki, D., H. Mitsuzawa, et al. (2002). "The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*." J Biol Chem **277**(27): 24315-20.

Jacobs, A. A., P. L. Loeffen, et al. (1994). "Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*." Infect Immun **62**(5): 1742-8.

Jacques, M., M. Gottschalk, et al. (1990). "Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*." J Bacteriol **172**(6): 2833-8.

Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.

Janssens, S. and R. Beyaert (2003). "Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members." Mol Cell **11**(2): 293-302.

Jiang, Q., S. Akashi, et al. (2000). "Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B." J Immunol **165**(7): 3541-4.

Jobin, M. C. and D. Grenier (2003). "Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*." FEMS Microbiol Lett **220**(1): 113-9.

Johnson, J. L., E. E. Moore, et al. (1998). "Interleukin-6 augments neutrophil cytotoxic potential via selective enhancement of elastase release." J Surg Res **76**(1): 91-4.

Kanakaraj, P., P. H. Schafer, et al. (1998). "Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production." J Exp Med **187**(12): 2073-9.

Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." Annu Rev Immunol **18**: 621-63.

Katsumi, M., T. Saito, et al. (1996). "Comparative preparation methods of sialylated capsule antigen from *Streptococcus suis* type 2 with type specific antigenicity." J Vet Med Sci **58**(10): 947-52.

Kawai, T., O. Adachi, et al. (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." Immunity **11**(1): 115-22.

Kawai, T., O. Takeuchi, et al. (2001). "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." J Immunol **167**(10): 5887-94.

Kawasaki, K., S. Akashi, et al. (2000). "Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol." J Biol Chem **275**(4): 2251-4.

Khan, A. Q., Q. Chen, et al. (2005). "Both innate immunity and type 1 humoral immunity to *Streptococcus pneumoniae* are mediated by MyD88 but differ in their relative levels of dependence on toll-like receptor 2." Infect Immun **73**(1): 298-307.

Kielian, T., N. Esen, et al. (2005). "Toll-like receptor 2 (TLR2) is pivotal for recognition of *S. aureus* peptidoglycan but not intact bacteria by microglia." Glia **49**(4): 567-76.

Kilpper-Balz, R. and K. H. Schleifer (1987). "*Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev." International Journal of Systemic Bacteriology **37**(2): 160-162.

Kinjyo, I., T. Hanada, et al. (2002). "SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation." Immunity **17**(5): 583-91.

Knapp, S., C. W. Wieland, et al. (2004). "Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense." J Immunol **172**(5): 3132-8.

Kobayashi, K., L. D. Hernandez, et al. (2002). "IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling." Cell **110**(2): 191-202.

Koedel, U., T. Rupprecht, et al. (2004). "MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS." Brain **127**(Pt 6): 1437-45.

Lalonde, M., M. Segura, et al. (2000). "Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines." Microbiology **146** (Pt 8): 1913-21.

Langford, P., A. E. Williams, et al. (1991). "Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates." FEMS Microbiol Lett **61**(2-3): 347-50.

Latz, E., A. Schoenemeyer, et al. (2004). "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome." Nat Immunol **5**(2): 190-8.

Lehner, M. D., S. Morath, et al. (2001). "Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators." J Immunol **166**(8): 5161-7.

Lemaitre, B. (2004). "The road to Toll." Nat Rev Immunol **4**(7): 521-7.

Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-83.

Leturcq, D. J., A. M. Moriarty, et al. (1996). "Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock." J Clin Invest **98**(7): 1533-8.

Li, S., A. Strelow, et al. (2002). "IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5567-72.

- Li, X., M. Commane, et al. (1999). "Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase." Mol Cell Biol **19**(7): 4643-52.
- Lien, E., T. J. Sellati, et al. (1999). "Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products." J Biol Chem **274**(47): 33419-25.
- Liu, Y., Y. Wang, et al. (2001). "Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa b activation." Infect Immun **69**(5): 2788-96.
- Lord, K. A., B. Hoffman-Liebermann, et al. (1990). "Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6." Oncogene **5**(7): 1095-7.
- Luderitz, O., A. M. Staub, et al. (1966). "Immunochemistry of O and R antigens of Salmonella and related Enterobacteriaceae." Bacteriol Rev **30**(1): 192-255.
- Lun, S., J. Perez-Casal, et al. (2003). "Role of suilysin in pathogenesis of Streptococcus suis capsular serotype 2." Microb Pathog **34**(1): 27-37.
- Lutticken, R., N. Temme, et al. (1986). "Meningitis caused by Streptococcus suis: case report and review of the literature." Infection **14**(4): 181-5.
- Lynn, W. A., Y. Liu, et al. (1993). "Neither CD14 nor serum is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide." Infect Immun **61**(10): 4452-61.

MacInnes, J. I. and R. Desrosiers (1999). "Agents of the "suis-ide diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*." Can J Vet Res **63**(2): 83-9.

Malley, R., P. Henneke, et al. (2003). "Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1966-71.

Mancuso, G., A. Midiri, et al. (2004). "Dual role of TLR2 and myeloid differentiation factor 88 in a mouse model of invasive group B streptococcal disease." J Immunol **172**(10): 6324-9.

Matsumoto, M., K. Funami, et al. (2003). "Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells." J Immunol **171**(6): 3154-62.

McDonald, C., N. Inohara, et al. (2005). "Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease." J Biol Chem **280**(21): 20177-80.

Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.

Michelsen, K. S., A. Aicher, et al. (2001). "The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCS). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2." J Biol Chem **276**(28): 25680-6.

Miller, S. I., R. K. Ernst, et al. (2005). "LPS, TLR4 and infectious disease diversity." Nat Rev Microbiol **3**(1): 36-46.

Morath, S., A. Geyer, et al. (2001). "Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*." J Exp Med **193**(3): 393-7.

Morath, S., A. Geyer, et al. (2002). "Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic Acid preparations." Infect Immun **70**(2): 938-44.

Morath, S., A. Stadelmaier, et al. (2002). "Synthetic lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus of cytokine release." J Exp Med **195**(12): 1635-40.

Moreillon, P. and P. A. Majcherczyk (2003). "Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria." Scand J Infect Dis **35**(9): 632-41.

Moxon, E. R. and J. S. Kroll (1990). "The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors." Curr Top Microbiol Immunol **150**: 65-85.

Muneta, Y., H. Uenishi, et al. (2003). "Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection." J Interferon Cytokine Res **23**(10): 583-90.

Muzio, M., J. Ni, et al. (1997). "IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling." Science **278**(5343): 1612-5.

Nagai, Y., S. Akashi, et al. (2002). "Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution." Nat Immunol **3**(7): 667-72.

Nakagawa, R., T. Naka, et al. (2002). "SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses." Immunity **17**(5): 677-87.

Normile, D. (2005). "Infectious diseases. WHO probes deadliness of China's pig-borne disease." Science **309**(5739): 1308-9.

Norton, P. M., C. Rolph, et al. (1999). "Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin." FEMS Immunol Med Microbiol **26**(1): 25-35.

Ohashi, K., V. Burkart, et al. (2000). "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." J Immunol **164**(2): 558-61.

Okamura, Y., M. Watari, et al. (2001). "The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4." J Biol Chem **276**(13): 10229-33.

Okwumabua, O., O. Abdelmagid, et al. (1999). "Hybridization analysis of the gene encoding a hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis* type 2: evidence for the absence of the gene in some isolates." FEMS Microbiol Lett **181**(1): 113-21.

Opitz, B., N. W. Schroder, et al. (2001). "Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation." J Biol Chem **276**(25): 22041-7.

Ozinsky, A., D. M. Underhill, et al. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-71.

Palmer, M. (2001). "The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins." Toxicon **39**(11): 1681-9.

Perch, B., P. Kristjansen, et al. (1968). "Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis." Acta Pathol Microbiol Scand **74**(1): 69-76.

Picard, C., A. Puel, et al. (2003). "Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency." Science **299**(5615): 2076-9.

Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.

Poltorak, A., I. Smirnova, et al. (1998). "Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region." Blood Cells Mol Dis **24**(3): 340-55.

Pridmore, A. C., G. A. Jarvis, et al. (2003). "Activation of toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4/MD2 by Neisseria is independent of capsule and lipooligosaccharide (LOS) sialylation but varies widely among LOS from different strains." Infect Immun **71**(7): 3901-8.

Pugin, J., I. D. Heumann, et al. (1994). "CD14 is a pattern recognition receptor." Immunity **1**(6): 509-16.

Pugin, J., C. C. Schurer-Maly, et al. (1993). "Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2744-8.

Pulliainen, A. T., A. Kauko, et al. (2005). "Dps/Dpr ferritin-like protein: insights into the mechanism of iron incorporation and evidence for a central role in cellular iron homeostasis in Streptococcus suis." Mol Microbiol **57**(4): 1086-100.

Quessy, S., P. Busque, et al. (1997). "Description of an albumin binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2." FEMS Microbiol Lett **147**(2): 245-50.

Raetz, C. R. and C. Whitfield (2002). "Lipopolysaccharide endotoxins." Annu Rev Biochem **71**: 635-700.

Rassa, J. C., J. L. Meyers, et al. (2002). "Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2281-6.

Rietschel, E. T. and J. M. Cavaillon (2002). "Endotoxin and anti-endotoxin. The contribution of the schools of Koch and Pasteur: life, milestone-experiments and concepts of Richard Pfeiffer (Berlin) and Alexandre Besredka (Paris)." J Endotoxin Res **8**(2): 71-82.

Rietschel, E. T. and J. M. Cavaillon (2002). "Endotoxin and anti-endotoxin. The contribution of the schools of Koch and Pasteur: life, milestone-experiments and concepts of Richard Pfeiffer (Berlin) and Alexandre Besredka (Paris)." J Endotoxin Res **8**(1): 3-16.

Ring, A., J. N. Weiser, et al. (1998). "Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway." J Clin Invest **102**(2): 347-60.

Rosenthal, R. S. and R. Dziarski (1994). "Isolation of peptidoglycan and soluble peptidoglycan fragments." Methods Enzymol **235**: 253-85.

Sandor, F., E. Latz, et al. (2003). "Importance of extra- and intracellular domains of TLR1 and TLR2 in NFkappa B signaling." J Cell Biol **162**(6): 1099-110.

Sanford, S. E. (1987). "Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. II. Central nervous system lesions." Can J Vet Res **51**(4): 486-9.

Sanjo, H., K. Takeda, et al. (2003). "TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for interleukin-1 signaling." Mol Cell Biol **23**(4): 1231-8.

Schleifer, K. H. and O. Kandler (1972). "Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications." Bacteriol Rev **36**(4): 407-77.

Schromm, A. B., E. Lien, et al. (2001). "Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling." J Exp Med **194**(1): 79-88.

Segers, R. P., T. Kenter, et al. (1998). "Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains." FEMS Microbiol Lett **167**(2): 255-61.

Segura, M. and M. Gottschalk (2002). "Streptococcus suis interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity." Infect Immun **70**(8): 4312-22.

Segura, M., M. Gottschalk, et al. (2004). "Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis." Infect Immun **72**(9): 5322-30.

Segura, M., J. Stankova, et al. (1999). "Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages." Infect Immun **67**(9): 4646-54.

Segura, M., N. Vadeboncoeur, et al. (2002). "CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2." Clin Exp Immunol **127**(2): 243-54.

Serhir, B., R. Higgins, et al. (1993). "Detection of immunoglobulin-G-binding proteins in *Streptococcus suis*." J Gen Microbiol **139**(12): 2953-8.

Shibuya, H., K. Yamaguchi, et al. (1996). "TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction." Science **272**(5265): 1179-82.

Shimazu, R., S. Akashi, et al. (1999). "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4." J Exp Med **189**(11): 1777-82.

Slack, J. L., K. Schooley, et al. (2000). "Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways." J Biol Chem **275**(7): 4670-8.

Smith, H. E., M. Damman, et al. (1999). "Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor." Infect Immun **67**(4): 1750-6.

Smith, H. E., F. H. Reek, et al. (1993). "Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains." Infect Immun **61**(8): 3318-26.

Smith, H. E., U. Vecht, et al. (1992). "Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2." Infect Immun **60**(6): 2361-7.

Smith, H. E., U. Vecht, et al. (1996). "Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs." *Infect Immun* **64**(10): 4409-12.

Smith, H. E., H. J. Wisselink, et al. (1997). "Virulence markers of *Streptococcus suis* type 1 and 2." *Adv Exp Med Biol* **418**: 651-5.

Song, L. and J. S. Pachter (2004). "Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells." *Microvasc Res* **67**(1): 78-89.

St Geme, J. W., 3rd and D. Cutter (1996). "Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b." *Mol Microbiol* **21**(1): 21-31.

Staats, J. J., B. L. Plattner, et al. (1999). "Presence of the *Streptococcus suis* suilysin gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in *Streptococcus suis* type 2 isolates." *Vet Microbiol* **70**(3-4): 201-11.

Stoiber, D., P. Kovarik, et al. (1999). "Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma." *J Immunol* **163**(5): 2640-7.

Strangmann, E., H. Froleke, et al. (2002). "Septic shock caused by *Streptococcus suis*: case report and investigation of a risk group." *Int J Hyg Environ Health* **205**(5): 385-92.

Suankratay, C., P. Intalapaporn, et al. (2004). "*Streptococcus suis* meningitis in Thailand." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **35**(4): 868-76.

Suzuki, N., S. Suzuki, et al. (2002). "Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4." Nature **416**(6882): 750-6.

Swantek, J. L., M. F. Tsen, et al. (2000). "IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin." J Immunol **164**(8): 4301-6.

Takaesu, G., R. M. Surabhi, et al. (2003). "TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway." J Mol Biol **326**(1): 105-15.

Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.

Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (2000). "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection." J Immunol **165**(10): 5392-6.

Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-51.

Takeuchi, O., T. Kawai, et al. (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." Int Immunol **13**(7): 933-40.

Takeuchi, O., S. Sato, et al. (2002). "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins." J Immunol **169**(1): 10-4.

Thanawongnuwech, R., P. G. Halbur, et al. (2000). "The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection." Anim Health Res Rev **1**(2): 95-102.

Thomas, J. A., J. L. Allen, et al. (1999). "Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase." J Immunol **163**(2): 978-84.

Tikkanen, K., S. Haataja, et al. (1996). "The galactosyl-(alpha 1-4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies." Infect Immun **64**(9): 3659-65.

Tohno, M., T. Shimosato, et al. (2005). "Toll-like receptor 2 is expressed on the intestinal M cells in swine." Biochem Biophys Res Commun **330**(2): 547-54.

Travassos, L. H., S. E. Girardin, et al. (2004). "Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition." EMBO Rep **5**(10): 1000-6.

Tsiotou, A. G. and G. H. Sakorafas (2004). "Management of septic shock: current concepts, with a particular emphasis on the role of source control, and future perspectives." Eur J Anaesthesiol **21**(5): 337-60.

Tuomanen, E. (1996). "Entry of pathogens into the central nervous system." FEMS Microbiol Rev **18**(4): 289-99.

Tuomanen, E. I., R. Austrian, et al. (1995). "Pathogenesis of pneumococcal infection." N Engl J Med **332**(19): 1280-4.

Ulevitch, R. J. and P. S. Tobias (1994). "Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling." Curr Opin Immunol **6**(1): 125-30.

Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, et al. (2002). "HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway." J Biol Chem **277**(17): 15107-12.

Vadeboncoeur, N., M. Segura, et al. (2003). "Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2." FEMS Immunol Med Microbiol **35**(1): 49-58.

Vanier, G., M. Segura, et al. (2004). "Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2." Infect Immun **72**(3): 1441-9.

Vecht, U., H. J. Wisselink, et al. (1991). "Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2." Infect Immun **59**(9): 3156-62.

Verhoef, J. and E. Mattsson (1995). "The role of cytokines in gram-positive bacterial shock." Trends Microbiol **3**(4): 136-40.

Vogel, S. N., G. S. Madonna, et al. (1984). "In vitro stimulation of C3H/HeJ spleen cells and macrophages by a lipid A precursor molecule derived from *Salmonella typhimurium*." J Immunol **132**(1): 347-53.

Wagner, H. (2004). "The immunobiology of the TLR9 subfamily." Trends Immunol **25**(7): 381-6.

Wald, D., J. Qin, et al. (2003). "SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling." Nat Immunol **4**(9): 920-7.

Wang, J. H., M. Doyle, et al. (2002). "Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with suppression of toll-like receptor 2 expression." J Biol Chem **277**(39): 36068-75.

Watson, J., R. Riblet, et al. (1977). "The response of recombinant inbred strains of mice to bacterial lipopolysaccharides." J Immunol **118**(6): 2088-93.

Weber, J. R., P. Moreillon, et al. (2003). "Innate sensors for Gram-positive bacteria." Curr Opin Immunol **15**(4): 408-15.

Weidemann, B., H. Brade, et al. (1994). "Soluble peptidoglycan-induced monokine production can be blocked by anti-CD14 monoclonal antibodies and by lipid A partial structures." Infect Immun **62**(11): 4709-15.

Wesche, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex." Immunity **7**(6): 837-47.

Wetzler, L. M. (2003). "The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity." Vaccine **21 Suppl 2**: S55-60.

Williams, A. E. and W. F. Blakemore (1990). "Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2." J Infect Dis **162**(2): 474-81.

Wilson, M., R. Seymour, et al. (1998). "Bacterial perturbation of cytokine networks." Infect Immun **66**(6): 2401-9.

Windsor, R. S. and S. D. Elliott (1975). "Streptococcal infection in young pigs. IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs." J Hyg (Lond) **75**(1): 69-78.

Wisselink, H. J., H. E. Smith, et al. (2000). "Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries." Vet Microbiol **74**(3): 237-48.

Wright, S. D. (1995). "CD14 and innate recognition of bacteria." J Immunol **155**(1): 6-8.

Wright, S. D., R. A. Ramos, et al. (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." Science **249**(4975): 1431-3.

Wyllie, D. H., E. Kiss-Toth, et al. (2000). "Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses." J Immunol **165**(12): 7125-32.

Xu, Y., X. Tao, et al. (2000). "Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains." Nature **408**(6808): 111-5.

Yamaguchi, K., K. Shirakabe, et al. (1995). "Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction." Science **270**(5244): 2008-11.

Yasukawa, H., A. Sasaki, et al. (2000). "Negative regulation of cytokine signaling pathways." Annu Rev Immunol **18**: 143-64.

Ye, H., J. R. Arron, et al. (2002). "Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling." Nature **418**(6896): 443-7.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Richard Graveline		
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Richard Graveline, Mariela Segura, Marcelo Gottschalk	
Titre <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 recognition by TLR2 confers responsiveness by human and murine macrophages.	
Revue Infeccion and Immunity	Date de publication

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Richard Graveline inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Rôle de TLR2 dans la réponse inflammatoire induite par Streptococcus suis de type 2. »</i>		
Coauteur Marcelo Gottschalk		Date 18/04/05
Coauteur Mariela Segura		Date 19/03/05
Coauteur		Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat mars 2001